UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Carolina Patrícia Sousa Curado

TRATAMENTO DE PASTAS *KRAFT* DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* COM XILANASES: EFEITO NOS PRIMEIROS ESTÁGIOS DE BRANQUEAMENTO (DE_P)

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química orientada pela Professora Doutora M. Graça V. S. Carvalho e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

TRATAMENTO DE PASTAS *KRAFT* DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* COM XILANASE: EFEITO NOS PRIMEIROS ESTÁGIOS DE BRANQUEAMENTO (DE_P)

Carolina Patrícia Sousa Curado

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química orientada pela Professora Doutora M. Graça V. S. Carvalho e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Este trabalho foi preparado no âmbito do projecto Inpactus – Produtos e Tecnologias Inovadoras a partir do Eucalipto, Projeto nº 21 874 financiado no Portugal 2020 através do Fundo de Desenvolvimento Regional (FEDER), Compete 2020, nº 246/Eixo II/2017 e no âmbito do projeto financiado pela FCT UID/EQU/00102/2013, Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE 2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização POCI-01-0145-FEDER-006910

Cofinanciado por:

Setembro de 2018

UNIVERSIDADE D COIMBRA

‘Eu sei que o meu trabalho é uma
gota no oceano, mas sem ele o oceano
seria menor.’

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio incondicional de muitas pessoas, as quais foram imprescindíveis nesta caminhada.

Em primeiro lugar começo por agradecer à minha orientadora, professora Graça Carvalho, por toda a orientação, apoio, dedicação e, principalmente, por despertar em mim o gosto pela área da pasta e do papel.

De seguida, agradeço à Engenheira Mestre Cátia Mendes, por toda ajuda prestada no laboratório e boa disposição demonstrada dia após dia.

Ao grupo The Navigator Company, pela disponibilização da pasta utilizada no presente estudo.

Ao RAIZ (Instituto de Investigação da Floresta e do Papel), pela lavagem da pasta, pela cedência do dióxido de cloro e da enzima e pela disponibilização dos equipamentos necessários aos testes de brancura e de reversão. Um especial agradecimento ao senhor José Carlos, por toda a amabilidade e disponibilidade demonstrada em todas as minhas idas ao RAIZ.

Aos meus colegas de laboratório, Ricardo Almeida, Beatriz Banaco e Rodrigo Pimenta, por toda a interajuda durante estes longos 5 meses de trabalho e por todos os momentos de descontração preciosos ao longo desta jornada.

Aos meus colegas e amigos, especialmente aqueles que fizeram parte do meu dia a dia. À Carmina, Carolina Silva, Tita, Joana, Ana Margarida, Sérgio, Filipa Ferreira e todos os outros com os quais partilhei as minhas mágoas e vitórias. Um especial agradecimento ao meu amigo Adriano por toda ajuda e palavras de coragem dadas no momento certo. Por último à Mariana, por todo o companheirismo e especialmente por tudo no que se tem tornado na minha vida.

A todos aqueles que me acompanharam neste percurso académico, quer nas aulas, trabalhos de grupos ou em momentos de folia, o meu sincero obrigada!

Aos meus pais, por me apoiarem sempre ao longo desta caminhada e me disponibilizarem os recursos necessários para aqui chegar. Em especial à minha mãe por estar sempre disponível para me ir buscar e levar a Coimbra.

Ao meu irmão e a toda a minha família, em particular à minha pequena sobrinha, que mesmo sem saber me deu um grande apoio nos dias menos bons deste percurso.

Ao Alexandre, por tudo o que significa e por todo o apoio incondicional demonstrado não só ao longo destes 5 anos, mas sempre!

A todos eles o meu mais sincero obrigada! Obrigada por tornarem estes 5 anos inesquecíveis!

Resumo

Devido às pressões ambientais e do mercado, o processo de branqueamento tem sofrido alterações ao longo dos últimos anos, principalmente com o foco na redução/eliminação de reagentes à base de cloro. A utilização de enzimas surge como uma alternativa promissora para este fim, sendo a xilanase a enzima mais utilizada e estudada, por ter sido confirmada a sua eficácia na eliminação de cromóforos.

O principal objetivo deste trabalho é estudar a influência da aplicação de xilanase (X) nos primeiros estágios de sequências de branqueamento de pastas *Kraft* não branqueadas de *Eucalyptus globulus* (XDE_P). Este estudo é efetuado em pasta tal qual recolhida na unidade industrial e em pasta posteriormente lavada em laboratório, de modo a avaliar o efeito do *carryover* na atuação da enzima. A xilanase utilizada apresentava uma atividade enzimática de 36090 U/mL e foram recolhidas duas amostras de pasta em dois momentos distintos (pasta P1 e P2). A pasta P1 foi utilizada para a determinação das condições operatórias adequadas para a aplicação da enzima e na pasta P2 estudou-se o efeito do *carryover*.

Na pasta crua P1 avaliou-se, em primeiro lugar, o desempenho da atuação da enzima em diferentes valores de pH, temperatura e carga enzimática. Para este estudo o tempo foi mantido constante e igual a 60 minutos. Com as condições operatórias definidas, aplicou-se o estágio enzimático na pasta crua (pastas P1 e P2), seguido do estágio de dióxido de cloro (D) e de uma extração alcanina com hidróxido de sódio, reforçada com peróxido de hidrogénio (E_P). Em todos estes estágios as condições operatórias utilizadas tiveram em consideração as condições aplicadas na torre de armazenamento de pasta crua na unidade fabril. Os resultados obtidos nas pastas XDE_P foram comparados com os obtidos nas pastas de controlo (cDE_P, em que c corresponde a um estágio nas mesmas condições operatórias de X, mas sem adição de enzima), relativamente a brancura ISO, teores de lenhina residual e ácidos hexenurónicos (HexA), viscosidade e estabilidade de brancura.

Na sequência XDE_P, o estágio X foi efetuado nas condições de temperatura, pH, carga enzimática e tempo de 65ºC; 8,5; 50 g/tAD e 60 minutos, respetivamente; o estágio de dióxido de cloro foi efetuado a uma carga de ClO_2 de 3,3% como Cl_2 ativo, 65ºC e 30 minutos; o estágio de extração alcalina, foi realizado a uma temperatura de 75ºC durante 80 minutos com uma carga de NaOH e H_2O_2 de 1,5% e 0,45%, respetivamente. A aplicação destas condições na pasta P1 (XDE_P), relativamente à pasta de controlo (cDE_P), promoveu um ganho de brancura de 2,8 unidades, um aumento da estabilidade de brancura (dimuição do PC number em cerca de 0,2 unidades) e uma remoção de lenhina residual e HexA em cerca de 21% e 7%, respetivamente, sem alteração significativa da viscosidade (que aumenta ligeiramente). Estes valores

evidenciam a atuação da xilanase, uma vez que esta promove a hidrólise parcial das xilanas, levando à dissolução de fragmentos contendo ligações lenhina-xilana (LCC) ou grupos hexenurónicos. Nesta pasta, o ganho de brancura obtido entre as sequências XDE_P e cDE_P referido acima foi superior ao ganho de brancura entre X e c (2,4 unidades), o que se deve ao facto da xilanase alterar a estrutura da fibra, permitindo uma maior atuação dos reagentes de branqueamento nos estágios subsequentes. No que diz respeito à perda de rendimento verificou-se uma perda de 1,3 unidades (XDE_P em relação a cDE_P) com uma poupança de ClO_2 de 17%.

Quanto ao efeito do *carryover* estudado na pasta P2, verificou-se que este não inibe a atuação da enzima, uma vez que o ganho de brancura atingido foi superior na pasta não lavada. Embora a brancura atingida seja inferior, a atuação da enzima aparenta ser mais eficaz nesta pasta. Para a pasta não lavada, observa-se uma menor remoção de HexA e uma remoção de lenhina ligeiramente superior, em relação ao controlo. A viscosidade e a estabilidade de brancura no tempo são semelhantes em ambas as pastas (lavada e não lavada). Esta constatação torna-se interessante a nível industrial, visto que é possível a utilização de enzimas com o filtrado de lavagem fabril, reduzindo assim os custos operacionais relacionados com a implementação desta tecnologia. A perda de rendimento em relação à pasta de controlo foi semelhante quando se usou pasta P2 lavada ou não lavada e uma sequência XDE_P com 50 g/tAD no estágio X.

O efeito do estágio X na poupança de reagentes de branqueamento foi adicionalmente avaliado numa sequência XDE_P (X: 50 g/tAD, pH 8,5 e 65ºC; D: 3,7% como Cl_2 ativo; E_P: 1,35% NaOH e 0,36% H_2O_2), tendo esta sido comparada com uma sequência cDE_P (c: pH 8,5 e 65ºC; D: 4,1% como Cl_2 ativo; E_P: 1,5% NaOH e 0,45% H_2O_2). Para este estudo verificou-se uma poupança simultânea dos três reagentes de branqueamento em pelo menos 10% na carga de ClO_2 e de NaOH e 20% na carga de H_2O_2.

Palavras-chave: Branqueamento; xilanase; *eucalyptus globulus*; *carryover*; poupança de reagentes.

Abstract

Due to environmental and market pressure, the bleaching process has been suffering changes over the last years, primarily in the reduction/elimination of chlorine-based reagents. Enzymes usage appears as a promising alternative for this purpose, being xylanase the most used and studied enzyme, because its efficacy to eliminate cromophores has been confirmed.

The main goal of this work is to study the influence of xylanase (X) application on the first bleaching stages of unbleached Kraft pulps from Eucalyptus globulus (XDE_P). This study is carried out in a pulp as collected in the industrial site and in a pulp subsequently washed in the laboratory, in order to evaluate the carryover effect on the enzyme performance. The xylanase presented an enzymatic activity of 36090 U/mL and two pulp samples were collected at two distinct times (pulp P1 and P2). The pulp P1 was used for the determination of the adequate operational conditions for the enzyme application and the carryover effect was studied in the pulp P2.

Firstly, in the unbleached pulp P1, the performance of the enzyme was studied at differents pH, temperature and enzymatic loading. The time was always kept constant and equal to 60 minutes. Having defined the operational conditions, the enzymatic stage was applied on the unbleached pulp (pulps P1 and P2), followed by the chlorine dioxide stage (D) and the alkaline extraction with sodium hydroxide, reinforced with hydrogen peroxide (E_P). The conditions observed in the unbleached pulp storage tower of the industrial unit were taken into consideration in all of the stages. The obtained results on the XDE_P pulps were compared with the ones from the control pulp (cDE_P, in which c corresponds to one stage in the same operational conditions as X, but without enzyme addition), relatively to ISO brightness, residual lignin and hexenuronic acid (HexA) content, viscosity and brightness stability.

In the XDE_P sequence, the X stage was performed in the following temperature, pH, enzimatic loading and time conditions: 65ºC; 8,5; 50 g/tAD and 60 minutes, respectively; the chlorine dioxide stage was carried out at a ClO_2 loading of 3.3% as active Cl_2, 65 °C and 30 minutes; the alkaline extraction stage was performed at a temperature of 75 °C for 80 minutes with a NaOH and H_2O_2 loading of 1.5% and 0.45%, respectively. The application of these conditions on pulp P1 (XDE_P), relatively to the control pulp (cDE_P), promoted a brightness gain of 2,8 units, an increase of brightness stability (decrease of PC number by about in 0,2 units) and a residual lignin and HexA removal of about 21 and 7%, respectively, without significant change in viscosity (which increased slightly). These values enlighten the xylanase performance, since it promotes the xylans partial hydrolysis, leading to the dissolution of fragments containing lignin-xylan bonds (LCC) or hexenuronic groups. In this pulp, the

brightness gain obtained between the XDE_P and cDE_P sequences referred above was higher than the brightness gain between X and c (2,4 units), which is due to the fact that xylanase changes the fiber structure, allowing a better performance of the bleaching reagents in the later stages. Regarding yield loss, it was registered a value of 1.3 units (XDE_P in relation to cDE_P) with a ClO_2 saving of 17%.

Concerning the carryover effect studied in pulp P2, it was verified that this does not inhibit the enzyme performance, once the brightness gain is higher in the unwashed pulp. Although the brightness is lower, the enzyme appears to be more effective in this pulp. For the unwashed pulp, a lower HexA removal and slightly higher lignin removal is observed, compared to the control. The viscosity and the brightness stability are similar in both pulps (washed and unwashed). This confirmation becomes industrially interesting, due to the possible usage of enzymes with the industrial washing filtrate, lowering the operational costs related with this technology implementation. The yield loss in comparison to the control pulp was similar when the washed or unwashed pulp P2 was used and a sequence XDE_P was applied with 50 g/tAD in the X stage.

The effect of X stage in the savings of bleaching reagents was additionally evaluated in a XDE_P sequence (X: 50 g/tAD, pH 8,5 and 65ºC; D: 3,7% as active Cl_2; E_P: 1,35% NaOH e 0,36% H_2O_2), having this been compared with the cDE_P sequence (c: pH 8,5 and 65ºC; D: 4,1% as active Cl_2; E_P: 1,5% NaOH e 0,45% H_2O_2). For this study a simultaneous saving of the three bleaching reagents was verified in at least 10% on the ClO_2 and NaOH loading and 20% on the H_2O_2 loading.

Keywords: Bleaching; xylanase; eucalyptus globulus; carryover; reagents saving.

Índice

1. Introdução **1**
1.1. Organização da Dissertação 4
2. Composição Química da Madeira **5**
2.1. Celulose 6
2.2. Hemiceluloses 7
2.3. Lenhina 8
2.4. Extratáveis e Cinzas 9
3. Cozimento *Kraft* **11**
3.1. Etapas do Processo de Cozimento *Kraft* 13
3.2. Reações com a Lenhina 14
3.3. Reações com os Polissacarídeos 17
4. Branqueamento de Pastas *Kraft* **21**
4.1. Tratamento Enzimático 24
4.1.1. Xilanases 26
4.1.2. Lacases 32
4.2. Dióxido de Cloro 33
4.3. Extração Alcalina 35
4.3.1. Extração Alcalina Reforçada com Peróxido de Hidrogénio 36
5. Materiais e Métodos **39**
5.1. Matéria Prima 39
5.2. Determinação da Atividade Enzimática 40
5.3. Branqueamentos 41
5.3.1. Tratamento Enzimático 41
5.3.2. Dióxido de Cloro 42
5.3.3. Extração Alcalina com Hidróxido de Sódio Reforçada com Peróxido de Hidrogénio 43
5.4. Caracterização das Pastas 44
5.4.1. Índice Kappa (IK) 44
5.4.2. Ácidos Hexenurónicos (HexA) 45
5.4.3. Viscosidade Intrínseca 46
5.4.4. Brancura ISO 46
5.4.5. Estabilidade de Brancura / Reversão de Brancura 47
6. Apresentação e Discussão de Resultados **49**
6.1. Determinação da Atividade Enzimática 49
6.2. Caracterização das Pastas Cruas 49
6.3. Desempenho da Enzima em Diferentes Condições Operatórias 50
6.4. Curvas de Branqueamento (DEp) 56
6.5. Sequência XDEp e cDEp (Controlo) 60
6.5.1. Pasta P1 60

6.5.2. Pasta P2 62
6.6. Rendimento 67
6.7. Poupança de Reagentes 68
6.7.1. Pasta P1 68
6.7.2. Pasta P2 69
7. Conclusões 73
8. Sugestões de Trabalho Futuro 75
Bibliografia 77
Anexos 85
Anexo I. Diagrama simplificado do processo 86
Anexo II. Metodologias experimentais detalhadas 86
II.1. Determinação da atividade enzimática da xilanase 86
II.2. Preparação dos ensaios 88
II.2.1. Determinação do teor de secura e da quantidade de pasta húmida 89
II.2.2. Cálculo da quantidade de reagentes 89
II.2.3. Preparação da solução tampão 90
II.2.4. Determinação da concentração de dióxido de cloro concentrado 91
II.2.5. Preparação da Solução de NaOH 94
II.2.6. Determinação da concentração de peróxido de hidrogénio concentrado 95
II.3. Metodologia experimental de branqueamentos 97
II.4. Cálculo da atividade enzimática em diferentes unidades 98
II.5. Filtrados residuais 100
II.5.1. Determinação da concentração residual de ClO_2 100
II.5.2. Determinação da concentração residual de H_2O_2 100
II.5.3. Determinação da concentração residual de NaOH 100
II. 6. Caracterização de pastas 102
II.6.1. Determinação do Índice Kappa (IK) 102
II.6.2. Determinação de ácidos hexenurónicos (HexA) 105
II.6.3. Determinação da Viscosidade Intrínseca 107
II.6.4. Preparação de folhas para medição de Brancura ISO 110
Anexo III – Resultados Experimentais Obtidos 112
III.1. Atividade Enzimática 112
III.2. Desempenho da Enzima em Diferentes Condições Operatórias na Pasta P1 115
III.3. Tratamento Enzimático preliminar na Pasta P2 Lavada e Não Lavada 116
III.4. Curvas de Branqueamento (Sequência DE) 116
III.5. Sequência XDE 117
Anexo IV – Segurança na Dissertação 121

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da celulose (Sjöström, 1993). 6
Figura 2 – Estrutura química parcial da O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano presente nas *hardwoods* (Sjöström, 1993). 7
Figura 3 – Fórmula abreviada da glucomanana presente nas *hardwoods* (Sjöström, 1993). 8
Figura 4 – Precursores primários da lenhina: a) álcool p-cumarílico; b) álcool coniferílico; c) álcool sinapílico (Adaptado de Fengel & Wegener, 1989). 8
Figura 5 – Esquema da estrutura da lenhina do pinheiro (Adaptado de Adler, 1977). 9
Figura 6 – Fases da deslenhificação e reações dos componentes da madeira (Adaptado de Sixta, 2006). 14
Figura 7 – Clivagem da ligação éter β-arilo em unidades fenólicas durante o processo de cozimento *kraft* (Adaptado de Sjöström, 1993). 15
Figura 8 – Clivagem da ligação éter α-arilo em unidades fenólicas em meio básico (Adaptado de Sjöström, 1993). 15
Figura 9 – Clivagem das ligações β-aril-éter em unidades não fenólicas (Sjöström, 1993). 16
Figura 10 – Exemplo de uma reação de condensação na lenhina do tipo G, durante o processo de cozimento kraft (Sjöström, 1993). 16
Figura 11 – Formação de cromóforos a partir de subestruturas de lenhina fenólica (Sixta, 2006). 17
Figura 12 – Esquema modelo da degradação dos polissacarídeos sob condições alcalinas (Adaptado de Sixta, 2006). 18
Figura 13 – Formação de HexA durante o processo de cozimento *kraft* (Buchert *et al.*, 1995). 19
Figura 14 – Formação de cromóforos a partir de hidratos de carbono (Sixta, 2006). 19
Figura 15 – Três principais classes de enzimas modificadoras da fibra (Adaptado de Novozymes, 2014). 25
Figura 16 – Possível estrutura do complexo lenhina-xilana em pastas kraft não branqueadas (Adaptado de Bajpai & Bajpai, 1997). 27
Figura 17 – Complexo enzimático necessário para a hidrólise completa da xilana (Adaptado de Beg et al., 2001). 28
Figura 18 – Exemplos de reações da lenhina residual com dióxido de cloro (Sjöström, 1993). 33
Figura 19 – Ácidos dicarboxílicos clorados (1 e 2) e não clorados (3 e 4) formados durante a reação do dióxido de cloro com os ácidos hexenurónicos (Vuorinen et al., 1997). 35
Figura 20 – Reações do peróxido de hidrogénio com a lenhina sob condições alcalinas (Suess, 2010). 37
Figura 21 – Metodologia experimental. 39
Figura 22 – Diferença de cor dos filtrados residuais obtidos após a aplicação de um estágio com enzima (escuro) e sem enzima (controlo-claro). 51
Figura 23 – Efeito da temperatura na remoção de lenhina (a) e de cromóforos (b), absorvância do filtrado a 280 e a 457 nm, respectivamente, usando uma carga enzimática de 100 g/tAD. 52
Figura 24 – Efeito do pH e carga enzimática na variação de IK, relativamente à pasta crua P1, para a temperatura de 65ºC. 53
Figura 25 – Efeito do pH e carga enzimática na Brancura ISO (Pasta P1), para a temperatura de 65ºC. 53
Figura 26 – Efeito da temperatura no ganho de brancura, relativamente à pasta crua P1, para pH de 8,5. 54
Figura 27 – Evolução da brancura em função da carga de ClO_2 aplicada na pasta P1. 57
Figura 28 – PC number em função da carga de ClO_2 para as curvas de branqueamento (Pasta P1). 59
Figura 29 – Evolução da brancura ISO na pasta P2 lavada e não lavada em função da carga enzimática, para uma carga de ClO_2 de 3,3% (Cl_2 ativo), após uma sequência XDE. 63

Figura 30 – Filtrados residuais obtidos para as pastas lavadas (residuais claros) e não lavada (residuais escuros) – Pasta P2. 63
Figura 31 – Evolução do Pc number em função da carga enzimática para as pastas lavada e não lavada após uma sequência XDE com a carga de 3,3% de ClO_2 (Cl_2 ativo) na pasta P2. 66
Figura 32 – Poupança de dióxido de cloro na pasta P1 com a aplicação da xilanase a 50 g/tAD, pH 8,5 e 65ºC. Target com uma carga de 3,3% (Cl_2 ativo) de dióxido de cloro. 69
Figura 33 - Brancura da pasta P2 com diferentes cargas de dióxido de cloro (controlo) e com a aplicação da xilanase a 50 e 100 g/tAD, pH 8,5 e 65ºC (target com uma carga de 3,3% de dióxido de cloro, como Cl_2 ativo): a) pasta lavada; b) pasta não lavada. 70
Figura 34 – Comparação da brancura entre a aplicação de uma sequência XDE (50 g/tAD; pH 9; 65ºC; 3,7% ClO_2; 0,36% H_2O_2 e 1,35% NaOH) e cDE (Branco; pH9; 65ºC; 4,1% ClO_2; 0,45% H_2O_2 e 1,5% NaOH). 71

Figura I – Diagrama de processo simplificado da zona de recolha das pastas utilizadas..... 86
Figura II – Curva de calibração obtida para a determinação da atividade enzimática. 113
Figura III – Curva padrão da atividade da xilanase. 114

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição química das softwoods e hardwoods (Adaptado de Gullichsen & Fogelholm, 1999 e Sjöström, 1993). 5
Tabela 2 – Exemplo de enzimas utilizadas nos processos de pasta e papel (Adaptado de Novozymes, 2014). 25
Tabela 3 – Condições de operação do estágio enzimática (X) e sequências estudadas. 30
Tabela 4 – Condições utilizadas nos estágios enzimáticos. 42
Tabela 5 – Condições utilizadas nos estágios de branqueamento com dióxido de cloro. 43
Tabela 6 – Condições utilizadas nos estágios de branqueamento de extração alcalina (E_P). 43
Tabela 7 – Atividade enzimática da Xilanase. 49
Tabela 8 – Caracterização das pastas cruas utilizadas. 50
Tabela 9 – Valores obtidos para IK e Brancura ISO apenas com a aplicação de tratamento enzimático na pasta P1. 51
Tabela 10 – Efeito das diferentes condições operatórias na remoção de HexA e lenhina (Pasta P1). . 55
Tabela 11 – Caracterização da pasta com estágio enzimático para pH 8,5, carga enzimática de 50 g/tAD e 65ºC e respetiva pasta controlo (P1). 56
Tabela 12 – Valores obtidos para IK, Viscosidade, HexA e IK corrigido nas diferentes curvas de branqueamento estudadas. 58
Tabela 13 – Brancura ISO e PC number nas sequências XDE (50g /tAD), cDE e DE para uma carga de 3,3% de ClO_2 (como Cl_2 ativo) na pasta P1. 61
Tabela 14 – IK, Viscosidade e HexA nas sequências XDE (50g /tAD), cDE e DE para uma carga de 3,3% de ClO_2 (como Cl_2 ativo) na pasta P1. 61
Tabela 15 – Ganhos de brancura relativamente ao controlo para as pastas lavadas e não lavada, após uma sequência XDE_P, usando 3,3% em Cl_2 ativo como carga de ClO_2. 64
Tabela 16 – IK, Viscosidade e HexA nas sequências XDE_P e cDE_P, para uma carga de 3,3% de ClO_2 (como Cl_2 ativo) na pasta P2 lavada e não lavada. 65
Tabela 17 – Rendimento e perda de rendimento em relação ao controlo após as sequências X e XDE_P para as pastas P1 e P2, com uma carga enzimática e de ClO_2 de 50 g/tAD e 3,3% (Cl_2 ativo), respetivamente. 67

Tabela I – Quantidades necessárias para a elaboração da curva de calibração para a determinação da atividade enzimática. 87
Tabela II – Massa de cada composto para preparar 1L de tampão B-R. 91
Tabela III – Preparação de tampão B-R a um determinado pH. 91
Tabela IV – Dados para as conversões. 98
Tabela V – Volume de cloreto de bário a utilizar em função do volume de filtrado disponível. 101
Tabela VI – Fator Fator d. Equação equivalente: d = (0,89301 + 0,021456*C). 105
Tabela VII – Massa de pasta a pesar, adequada aos valores previstos para a viscosidade da pasta. . 108
Tabela VIII – Produto c[η] correspondente a diferentes rácios de viscosidade ($\eta_{rácio}$). 110
Tabela IX – Valores obtidos para a construção da curva de calibração. 112
Tabela X – Condições utilizadas no tratamento enzimático na Pasta P1 e respetivos resultados obtidos. 115
Tabela XI – Tratamento enzimático preliminar na Pasta P2 (lavada e não lavada) e respetivos resultados obtidos. 116
Tabela XII – Condições utilizadas nas curvas de branqueamento na Pasta P1 e respetivos valores obtidos. 116
Tabela XIII – IK, IK corrigido, HexA e Viscosidade obtidos para as sequências XDE aplicada nas Pastas P1 e P2 lavada e respetivos controlos. 117

Tabela XIV – IK, IK corrigido, HexA e Viscosidade obtidos para as sequências XDE aplicadas na Pasta P2 não lavada e respetivos controlos. 118
Tabela XV – Brancura ISO, PC number e Rendimento obtidos para as sequências XDE aplicadas nas Pastas P1 e P2 lavada e respetivos controlos..... 119
Tabela XVI – Brancura ISO, PC number e Rendimento obtidos para as sequências XDE aplicadas na P2 não lavada e respetivos controlos. 120
Tabela XVII – Principais riscos e cuidados a ter no manuseamento dos compostos utilizados ao longo da dissertação..... 122

1. Introdução

O setor da pasta e do papel em Portugal, segundo dados estatísticos recentes, tem vindo a apresentar níveis de crescimento ao longo dos anos. Em 2016, a produção nacional de pastas de fibra virgem fixou-se em 2.729 mil toneladas, mais 2,5% do que no ano anterior, resultante da subida de 2,5% na pasta de eucalipto e de 2,7% na pasta de pinho. A nível europeu, Portugal ocupa o terceiro lugar entre os produtores de pasta, com 7,3% do total da produção e, no que diz respeito à produção de pastas químicas, ocupa também a terceira posição, com 9,8% de produção deste tipo de pasta. De um modo mais geral, de toda a produção europeia de pasta, 72% foram pastas químicas, enquanto que pastas mecânicas e semi-químicas representaram apenas 27,2%. Contudo, para os diferentes tipos de pasta referidos ocorreu um aumento da produção relativamente ao ano anterior (Celpa, 2016).

Dados estatísticos de 2010 indicam que a floresta portuguesa ocupava 3,2 milhões de hectares, ou seja 35,4% do território nacional. De entre as espécies florestais existentes, o eucalipto, o sobreiro e o pinheiro bravo ocupam as maiores áreas em Portugal continental, com 812 mil, 737 mil e 714 mil hectares, respetivamente (Celpa 2016). Para a produção de pasta, diversas unidades industriais portuguesas usam como matéria prima principal a madeira da espécie *Eucalyptus globulus*, uma vez que devido às suas propriedades, é considerada, por especialistas mundiais, a espécie ideal para a produção de papéis de impressão e escrita, devido às suas fibras de comprimento curto e ao número elevado de fibras por unidade de massa que conferem ao papel produzido excelentes propriedades físicas, óticas e de impressão como p.e. boa porosidade e formação e elevada opacidade (The Navigator Company, 2018; Celbi, 2018). Para além disso, também é relevante, o seu curto período de crescimento indicado para abate, cerca de 9 a 12 anos (Gominho *et al.*, 2015).

O fabrico de pasta é constituído por várias etapas, destacando-se as seguintes, depois da receção de madeira (Sjöström, 1993):

- Destroçamento dos toros, sendo reduzidos a aparas;
- Separação das fibras para posterior formação de pasta. Este processo pode ser feito de diversas formas, nomeadamente por cozimento químico, tratamento mecânico ou uma combinação dos dois. As pastas obtidas são designadas, respetivamente, por pastas químicas, mecânicas ou semi-químicas. O primeiro processo é o mais aplicado a nível mundial, e pode ser realizado em meio alcalino ou ácido. Enquanto que no segundo processo, as aparas são sujeitas a uma intensa ação mecânica;

- Lavagem e crivagem da pasta crua;
- Branqueamento da pasta crua, sendo esta etapa só efetuada para as pastas que exigem um certo nível de brancura. Este processo recorre a diferentes estágios com a aplicação de diferentes químicos, tais como, dióxido de cloro, peróxido de hidrogénio, oxigénio, ozono, hidróxido de sódio, entre outros.

De seguida, dependendo do tipo da unidade industrial, ou seja, se se trata de uma fábrica com produção integrada ou não, o processamento segue destinos diferentes. Assim, se a fábrica não for integrada a pasta obtida segue para uma máquina de pasta, onde irão ser formadas folhas, que posteriormente serão secas, cortadas, embaladas e enviadas para o mercado. No caso de fábricas integradas, onde a pasta irá dar origem a papel, seguem-se as etapas (Ferreira, 2000):

- Refinação, o que provoca alterações nas fibras conferindo maiores resistências mecânicas;
- Mistura das pastas com diferentes aditivos (cargas minerais, agentes de retenção, agentes de colagem, amido e branqueadores óticos), aumentando assim a qualidade do papel;
- Formação, prensagem, secagem e calandragem da folha, sendo este o conjunto de processos que integram a máquina de papel.

A maioria das indústrias contribuem de forma mais ou menos significativa para os problemas ambientais, incluindo aquecimento global, toxicidade humana, ecotoxicidade, oxidação fotoquímica, acidificação, nitrificação e resíduos sólidos. Os impactos ambientais mais significativos da indústria da pasta e do papel resultam dos processos de cozimento e branqueamento, uma vez que são produzidos poluentes gasosos, efluentes líquidos residuais e resíduos sólidos (Bajpai, 2012). No processo de branqueamento de pastas, o uso de reagentes químicos baseados em cloro dá origem a compostos organoclorados tóxicos, mutagénicos, persistentes e bioacumuláveis, causando inúmeros efeitos danosos nos sistemas biológicos (Cheng *et al.*, 2014; Gangwar *et al.*, 2015; Comlekcioglu *et al.*, 2014; Bajpai, 2012).

Devido às pressões ambientais e do mercado, o processo de branqueamento tem sofrido inúmeras mudanças ao longo dos anos, de modo a reduzir a quantidade de compostos organoclorados produzidos, nomeadamente a substituição do uso de cloro elementar por dióxido de cloro. Hoje em dia, são várias as opções mais "amigas" do ambiente, embora algumas requeiram um elevado custo de capital, como o uso de uma etapa de deslenhificação com oxigénio. O biobranqueamento das pastas cruas, isto é, o uso de enzimas em sequências de branqueamento, é uma das alternativas promissoras para a redução/eliminação de produtos

químicos à base de cloro e minimizar a formação de compostos organoclorados tóxicos nos efluentes (Gangwar *et al.*, 2014; Gangwar *et al.*, 2015). Este processo tem como vantagem a necessidade de pouco investimento de capital, tornando-o atrativo para o setor (Bajpai, 2012).

A adição de enzimas para melhorar a deslenhificação da pasta é bem conhecida, sendo a xilanase o tipo de enzima mais utilizado e estudado para esse fim. A aplicação de xilanases é por vezes referenciada como um pré-branqueamento ou *bleach boosting*. Um dos mecanismos citados é a hidrólise das xilanas reprecipitadas localizadas na superfície das microfibras da pasta. Esta atuação permite uma melhor penetração química dos reagentes nos estágios subsequentes (Cheng *et al.*, 2014). Vários estudos têm sido feitos com a aplicação de xilanases em sequências de branqueamento, onde se obtém normalmente resultados de poupança total de reagentes (na base cloro) acima de 20 a 25% para *hardwoods* e 10 a 15% para *softwoods*, com um decréscimo de 12 a 25% de compostos organoclorados produzidos (Shatalov A. & Pereira H., 2008; Tolan *et al.*, 1996).

A aplicação das xilanases apresenta-se como uma estratégia inovadora, ambiental e economicamente aceitável e a sua aplicação em pastas *kraft* de *Eucalyptus globulus*, é a motivação para o estudo efetuado no presente trabalho. O principal objetivo é estudar a influência da aplicação de xilanase nos primeiros estágios de sequências de branqueamento de pastas *kraft* não branqueadas de Eucalipto. Assim, irá ser aplicado um pré-tratamento enzimático em pasta crua proveniente de uma unidade industrial portuguesa e previamente lavada, onde inicialmente se verificará quais as melhores condições de atuação da enzima para o fim proposto, em termos das variáveis de pH, carga enzimática e temperatura. Após o tratamento enzimático, aplicar-se-á um estágio de dióxido de cloro, seguido de um estágio de extração alcalino com hidróxido de sódio reforçado com peróxido de hidrogénio, obtendo-se assim pastas XD_0E_p, que irão ser posteriormente comparadas com pastas cD_0E_p (controlo), em termos de poupança de reagentes de branqueamento, brancura atingida, remoção de lenhina e remoção de ácidos hexenurónicos. Para além destes estudos serem efetuados em pasta lavada, pretende-se efetuar o mesmo tipo de estudo em pasta não lavada, de modo a verificar e compreender a atuação da enzima na presença de *carryover* (compostos residuais presentes no líquido envolvente da pasta quando a lavagem desta em ambiente fabril não é totalmente eficiente) e assim aproximar o estudo às condições aplicadas nas fábricas. O uso de *carryover* em pasta crua e de soluções enzimáticas atualmente comercializadas são as principais diferenças relativamente a outros estudos elaborados no DEQ recorrendo também ao uso de xilanases no processo de branqueamento de pastas *kraft* de *E. globulus* (Esteves, 2013; Ferraz, 2013; Pinheiro, 2014; Sousa, 2012; Sintra, 2015).

1.1. Organização da Dissertação

O presente trabalho encontra-se dividido em nove capítulos. Começando no primeiro capítulo com uma breve introdução de enquadramento do tema, apresentação da motivação e objetivos do estudo efetuado.

No capítulo 2 apresenta-se uma breve referência à composição química das madeiras, evidenciando as principais diferenças entre *softwoods* e *hardwoods*, dando maior destaque aos principais componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lenhina.

No capítulo 3, de forma breve, explica-se o cozimento de pastas *kraft*, dando enfâse à reação do licor com os constituintes da madeira.

O capítulo 4 é dedicado ao processo de branqueamento, onde são referidos os principais reagentes de branqueamento, analisando com maior detalhe os estágios aplicados no presente trabalho, tais como, o estágio enzimático com a xilanase, dióxido de cloro e extração alcalina.

O quinto capítulo é reservado à apresentação da matéria prima e descrição da metodologia experimental utilizada nos estudos laboratoriais de branqueamento. Para além disso, é ainda apresentado as metodologias referentes à caracterização química das pastas.

No capítulo 6 apresenta-se os resultados obtidos e sua discussão, sendo este iniciado com a caracterização da pasta original proveniente de uma unidade industrial portuguesa e da determinação da atividade enzimática da xilanase utilizada no estudo. Para além disso, é evidenciado as poupanças de reagentes ocorrida da aplicação da enzima e a diferença quando se usa solução tampão ou filtrado fabril na realização do branqueamento. Neste capítulo, as pastas são ainda caracterizadas e os filtrados obtidos são analisados, de modo a um maior entendimento da atuação da xilanase na pasta.

No capítulo 7 são evidenciadas as principais conclusões do presente estudo. Por fim, o capítulo 8 reserva-se à apresentação de algumas sugestões de trabalhos complementares futuros para este estudo.

É de notar ainda, que no final encontra-se apresentada uma secção com a bibliografia que serviu de suporte à realização deste trabalho, bem como uma secção de anexos onde são apresentados resultados adicionais e metodologias experimentais detalhadas.

2. Composição Química da Madeira

A maioria das pastas químicas são produzidas a partir de aparas de madeira. As propriedades destas, bem como a sua estrutura morfológica, dependem de diversos fatores, nomeadamente da espécie e condições de crescimento (Gullichsen & Fogelholm, 1999).

As árvores podem ser subdivididas em dois grupos: gimnospérmicas e angiospérmicas. As *softwoods*, também designadas por resinosas (como o pinheiro e o abeto), fazem parte do primeiro grupo, enquanto que as *hardwoods*, também denominadas por folhosas (como o eucalipto e a bétula), se inserem no segundo grupo (Rowell, 2005; Sjöström, 1993). Estas duas classes contêm fibras que diferem entre si no comprimento, sendo este maior no caso das *softwoods* apresentando também diferenças na constituição celular, nomeadamente a presença de elementos de vaso nas *hardwoods*, ao contrário das *softwoods* (Sjöström, 1993).

A madeira é uma estrutura biológica complexa, composta em grande parte por carbono, hidrogénio e oxigénio (Rowell, 2005). Os principais compostos químicos da madeira podem ser divididos em dois grupos, o grupo das substâncias de baixo peso molecular, onde se inserem as cinzas e os extratáveis, e o grupo das substâncias de elevado peso molecular, como é o caso da lenhina, celulose e hemicelulose (Fengel & Wegener, 1989).

A composição química da madeira depende da espécie, sendo tipicamente o maior teor de lenhina e de extractáveis e o menor teor de celulose e hemiceluloses característicos das *softwoods*, como evidenciado na Tabela 1 (Gullichsen & Fogelholm, 1999).

Tabela 1 – Composição química das *softwoods* e *hardwoods* (Adaptado de Gullichsen & Fogelholm, 1999 e Sjöström, 1993).

Componente	***Softwoods*** **(%)**	***Hardwoods*** **(%)**
Celulose	41-46	42-49
Hemicelulose	25-32	23-34
Lenhina	26-31	20-26
Extratáveis	2-5	1-5
Cinzas	0,2-0,4	0,2-0,8

Nas secções seguintes irão ser focados os principais constituintes da madeira, nomeadamente, a celulose, hemicelulose e lenhina, fazendo-se também uma breve referência aos extratáveis e cinzas.

2.1. Celulose

Como apresentado na Tabela 1, a celulose é o principal constituinte da madeira, estando esta localizada principalmente na parede celular secundária (Sjöström, 1993).

A celulose é um homopolissacarídeo composto por unidades de β-D-glucopiranose que estão ligadas entre si através de ligações glicosídicas (1→4), tal como apresentado na Figura 1 (Sjöström, 1993). Devido a este tipo de ligação, a unidade de repetição corresponde a um dissacarídeo, a celobiose, e as moléculas são completamente lineares, permitindo a formação de ligações de hidrogénio inter e intramoleculares devido ao elevado número de grupos hidroxilo (Sjöström, 1993). Para além disso, formam agregados em forma de microfibrilas, onde regiões cristalinas (altamente ordenadas) se intercalam com regiões amorfas (menos ordenadas) (Sjöström, 1993; Neto *et al.*, 2005). Consequentemente, na parede celular, há regiões onde a celulose cristalina (maioria) não é acessível, enquanto as não cristalinas são acessíveis à entrada de água ou à ação de microorganismos, entre outros (Rowell,2005).

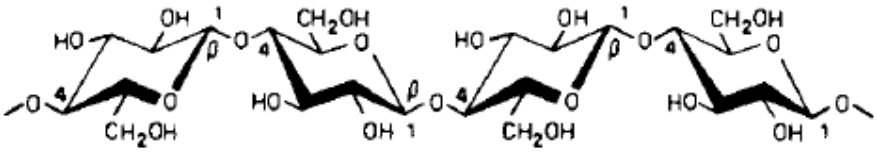


Figura 1 – Estrutura da celulose (Sjöström, 1993).

Devido à sua estrutura fibrosa e fortes ligações de hidrogénio, as fibras de celulose apresentam alta resistência à tração e insolubilidade na maior parte dos solventes (Sjöström, 1993). Por outro lado, a natureza cristalina da celulose, torna-a resistente ao ataque químico, pelo que, durante o processo de cozimento da pasta, ocorre a remoção de parte das hemiceluloses e da maior parte da lenhina, permanecendo no final uma estrutura fibrosa rica em celulose. Uma vez que, somente os ácidos e álcalis mais fortes conseguem alterar a rede cristalina, a celulose é o constituinte menos degradado durante os processos de obtenção da pasta (Walker, 2006).

2.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses, em comparação com a celulose, apresentam cadeias mais curtas e ramificadas e têm menor peso molecular (Sjöström, 1993). Devido ao seu baixo peso molecular e por conter estruturas não cristalinas, apresentam maior acessibilidade e suscetibilidade de sofrer hidrólise do que a celulose (Walker, 2006).

Os principais açúcares constituintes das hemiceluloses são as pentoses, como a L-arabinose e a D-xilose, e as hexoses, como a D-glucose, a D-manose e a D-galactose (Walker, 2006).

A composição e estrutura das hemiceluloses difere com o tipo de madeira. No caso das *softwoods*, as principais hemiceluloses presentes na sua constituição são as galactoglucomananas, representando cerca de 20%, seguidas da arabinoglucuroxilanas (5-10%), arabinogalactanas e outros polissacarídeos. Por outro lado, as *hardwoods* são constituídas por hemiceluloses do tipo glucuroxilanas (15-30%), glucomananas (2-5%) e outros polissacarídeos importantes para a vida da árvore (Sjöström, 1993).

As glucoroxilanas, também denominadas simplesmente por xilanas, apresentam na sua constituição unidades de β-D-xilopiranose ligadas entre si através de ligações β-(1→4) (Sjöström, 1993; Rowell, 2005; Neto *et al.*, 2005). A maioria das xilanas contém um grupo acetilo na posição C-2 ou C-3, sendo denominadas por O-acetil-4-O-metilglucurono-β-D-xilano (Figura 2), apresentando cerca de sete grupos acetilo por cada dez unidades de xilose. Para além disso, as xilanas também se ligam a ácido 4-O-metil-α-D-glucurónico através de ligações α-(1→2); em média cerca de um ácido urónico por cada dez unidades de xilose (Sjöström, 1993; Rowell, 2005).

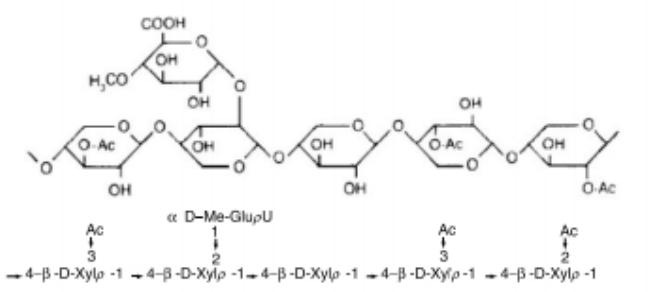


Figura 2 – Estrutura química parcial da O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano presente nas *hardwoods* (Sjöström, 1993).

Por outro lado, as glucomananas são compostas por unidades de β-D-glucopiranose e β-D-manopirose ligadas entre si através de ligações β-(1→4), tal como apresentado na Figura 3.

A razão glucose:manose varia entre 1:2 e 1:1 dependendo da espécie de madeira (Sjöström, 1993). As ligações manosídicas são mais rapidamente hidrolisadas por ácido que as ligações glucosídicas, pelo que as glucomananas são facilmente despolimerizadas sob condições ácidas (Sjöström, 1993).

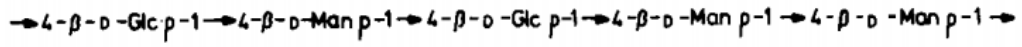


Figura 3 – Fórmula abreviada da glucomanana presente nas *hardwoods* (Sjöström, 1993).

2.3. Lenhina

A lenhina é uma substância aromática praticamente insolúvel na maioria dos solventes (Walker, 2006). É considerada a "cola" da madeira, uma vez que liga as células entre si, conferindo uma maior rigidez à parede celular. Embora a concentração da lenhina seja mais alta na lamela média, a maior parte situa-se na parede celular por esta ser mais espessa (Gullichsen & Fogelholm, 1999).

É um polímero com estrutura tridimensional muito complexa com grupos fenilpropano como unidade básica (Gullichsen & Fogelholm, 1999). Muitos estudos com carbono radioativo confirmaram que os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico são precursores primários e unidades de construção da lenhina (Figura 4), dando origem à denominada lenhina do tipo p-hidroxifenilo (H), do tipo guaiacilo (G) e do tipo seringilo (S), respetivamente (Fengel & Wegener, 1989; Neto *et al.*, 2005). O primeiro é um precursor minoritário das lenhinas de *hardwoods* e *softwoods*, o segundo é o precursor dominante das de *softwoods* e, os dois últimos (álcool coniferílico e sinapílico), encontram-se ambos presentes na lenhina das *hardwoods*, contendo uma razão G/S entre 4:1 e 1:2 (Pettersen, 1984; Adler, 1977; Walker, 2006).

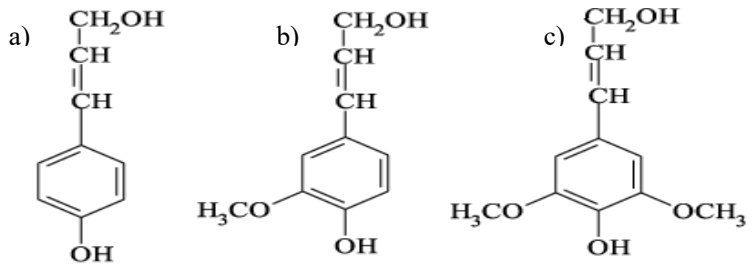


Figura 4 – Precursores primários da lenhina: a) álcool p-cumarílico; b) álcool coniferílico; c) álcool sinapílico (Adaptado de Fengel & Wegener, 1989).

A ligação mais frequente (superior a 50%) entre as unidades de lenhina nas *softwoods* e *hardwoods* é a ligação éter β-O-4. Contudo também existem outro tipo de ligações importantes,

como por exemplo a ligação 5-5' (carbono-carbono arilo-arilo), β-5 (carbono-carbono alquilalírica) e α-O-4 (éter alquilalírica) (Fengel & Wegener, 1989).

Como consequência dos diversos tipos de ligações, a lenhina apresenta uma estrutura muito complexa, como pode ser observado na Figura 5, onde se encontra esquematizada a lenhina presente no pinheiro (*Softwood*) (Adler, 1977; Fengel & Wegener, 1989; Walker, 2006; Sjöström, 1993).

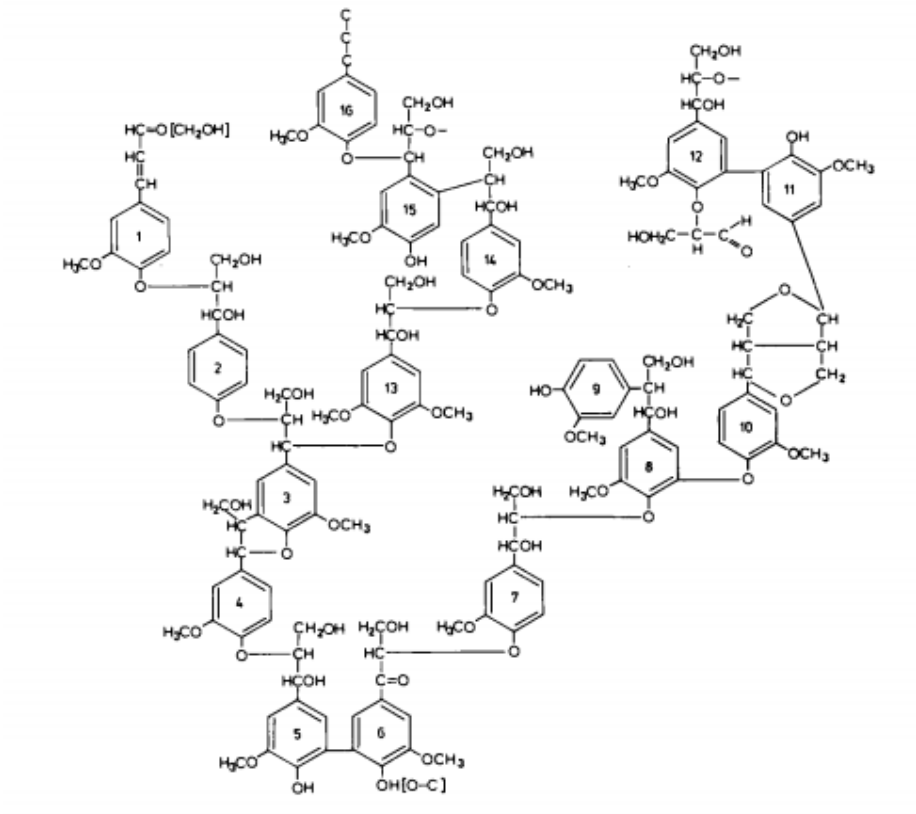


Figura 5 – Esquema da estrutura da lenhina do pinheiro (Adaptado de Adler, 1977).

2.4. Extratáveis e Cinzas

Os extratáveis da madeira, embora se apresentem em menor quantidade que a celulose, hemiceluloses e lenhina, são importantes uma vez que interferem no processo de obtenção de pasta e papel (Fengel & Wegener, 1989). Vários são os compostos extratáveis presentes na madeira, sendo que estes podem variar de acordo com a espécie. Na madeira de *hardwoods,* encontram-se extratáveis do tipo triterpenos, esteróis, ácidos e álcoois gordos livres, compostos polifenólicos (como taninos), aminoácidos, hidrocarbonetos saturados e açúcares solúveis (Fengel & Wegener, 1989). A presença de elevados valores de extratáveis dão origem a maiores perdas de rendimento de pasta e a um aumento do consumo de reagentes. Por outro lado, as

gorduras e os compostos polifenóis presentes poderão dificultar a deslenhificação, provocar o escurecimento da pasta e dificultar o processo de branqueamento (Mustnanta *et al.*, 1995). No entanto, como a maioria deles é removido durante o cozimento alcalino, não vão afetar significativamente o processo de branqueamento usado no presente trabalho.

Por último, as cinzas, são o componente minoritário da madeira e dizem respeito aos compostos inorgânicos presentes nesta, podendo ser constituídas por sais e silicatos (Sjöström, 1993).

3. Cozimento *Kraft*

O processo de cozimento *kraft* é o processo químico mais utilizado a nível mundial, representado cerca de 91% das pastas químicas e cerca de 75% da produção global de pastas (Bajpai, 2012). O processo de cozimento *kraft* apresenta algumas vantagens importantes, em relação aos demais tipos de cozimento, uma vez que (Sjöström, 1993; Walker, 2006; Fengel & Wegener, 1989):

- A recuperação de produtos químicos é mais simples e mais económica;
- Ocorre geração de calor durante o processo;
- Pode ser usado em qualquer espécie de madeira e permite a possibilidade do uso de madeira com casca;
- Apresenta tempos de cozimento mais curtos;
- Proporciona maior resistência físico-mecânica aos papéis produzidos (*kraft* significa 'resistente' em alemão e sueco).

Por outro lado, apresenta algumas desvantagens, sendo o principal problema o da libertação de odor desagradável, visto que pequenas quantidades de compostos à base de enxofre são detetadas pelo olfato (Fengel & Wegener, 1989). Para além disso, obtém-se um menor rendimento que o processo de cozimento ao sulfito de folhosas, dá origem a pastas cruas com uma cor mais escura e apresenta um elevado custo de investimento (Fengel & Wegener, 1989).

As pastas obtidas no processo de cozimento *kraft* são influenciadas por diversos parâmetros, tais como: a espécie e qualidade da madeira; a razão licor/madeira; o tempo e temperatura de cozimento; a carga, concentração e composição dos reagentes de cozimento (Fengel & Wegener, 1989).

No processo de cozimento ocorrem reações de degradação da lenhina utilizando um licor, que no caso do processo *kraft*, se trata de uma solução alcalina composta por hidróxido de sódio e sulfureto de sódio, solução conhecida no sector industrial por licor branco (Walker, 2006; Sjöström, 1993). A degradação da lenhina na matriz fibrosa permite a libertação das fibras de celulose que ocorre à saída do digestor (Sjöström, 1993).

Este tipo de cozimento, pode também ser designado por cozimento ao sulfato, uma vez que o sulfato de sódio é adicionado ao processo como composto de *make-up*, de modo a

compensar as perdas existentes de enxofre ao longo do mesmo, não interferindo diretamente na reação de deslenhificação (Fengel & Wegener, 1989; Sjöström, 1993).

De uma forma muito breve, a madeira chega à unidade industrial na forma de toros, onde irão ser descascados (com o objetivo de minimizar o consumo de químicos) e destroçados originando as aparas, de modo a ocorrer uma mais fácil impregnação dos químicos durante o processo de cozimento. De seguida, as aparas seguem para uma fase de crivagem, onde irão ser eliminadas aparas de tamanho indesejado (grossos e finos), permitindo assim uma maior uniformização do cozimento. O cozimento é efetuado em condições de pressão e temperatura elevadas, 7 a 12 atmosferas e 155 a 180˚C, respetivamente (Fengel & Wegener, 1989).

O cozimento dá-se em digestores contínuos ou descontínuos, sendo o cozimento contínuo o processo mais comum a nível industrial (Carvalho, 1999). O digestor contínuo mais utilizado é o digestor *Kamyr*, onde as aparas circulam no sentido descendente e tem na sua constituição 4 zonas distintas (Smook & Kocurek, 1982):

- Zona de impregnação: as aparas e o licor permanecem nesta zona a uma temperatura de 105 a 130˚C, durante 25 a 45 minutos, de modo a assegurar que as aparas fiquem completamente impregnadas com licor, facilitando e uniformizando o processo de cozimento;
- Zona de aquecimento: a temperatura é rapidamente aumentada para a temperatura final de cozimento (podendo variar entre 155 a 180˚C), sendo realizado em dois passos, usando dois sistemas de circulação de licor (permutadores externos);
- Zona de cozimento: a temperatura é mantida constante e igual à temperatura máxima desta zona. O processo de cozimento pode variar entre 1 a 3 horas e é interrompido através da extração do licor negro, que irá seguir para o ciclo de recuperação do mesmo;
- Zona de lavagem: é injetado em contracorrente licor proveniente dos lavadores externos da pasta, permitindo a deslocação da maior parte de licor restante dentro do digestor.

Por último as aparas são descomprimidas, formando a pasta crua e, esta por sua vez, é lavada e crivada de forma a remover do processo o aglomerado de fibras que não foram devidamente cozidas durante o cozimento.

3.1. Etapas do Processo de Cozimento *Kraft*

A deslenhificação ocorrida durante o processo de cozimento *kraft* pode ser dividida em três etapas, a deslenhificação inicial, principal e residual (Santos *et al.*, 1997; Sjöström, 1993; Walker, 2006; Sixta, 2006).

Na primeira etapa, onde ocorrem as reações abaixo dos 140˚C, verifica-se que a reação de deslenhificação é controlada por difusão. Nesta etapa, cerca de 15 a 25% da lenhina é removida, ocorre o maior consumo de reagentes alcalinos (cerca de 50%) e ocorre degradação e dissolução considerável dos hidratos de carbono de menor peso molecular (Sjöström, 1993; Santos *et al.*, 1997). Em cada etapa é removida diferentes tipos de lenhina, sendo que na etapa inicial se remove a lenhina mais reativa (Carvalho, 1999).

Na etapa intermédia, ocorre a principal dissolução da lenhina (cerca de 70%), e a quantidade de hidratos de carbono bem como a concentração dos reagentes químicos de cozimento, diminuem ligeiramente. Nesta etapa a reação de deslenhificação é controlada pela reação química (Santos *et al.*, 1997; Sixta, 2006).

Na última etapa, que começa quando cerca de 90% da lenhina é removida, a velocidade de deslenhificação diminui significativamente (Carvalho, 1999). No entanto, continua a diminuir a quantidade de hidratos de carbono e a aumentar o consumo da carga alcalina (Santos *et al.*, 1997).

É imediatamente após a etapa de deslenhificação principal que, normalmente, os processos de cozimento *kraft* são interrompidos, de modo a não provocar uma grande degradação dos polissacarídeos e consequente perda de rendimento (Carvalho, 1999).

Na Figura 6, encontram-se sumarizadas as reações que ocorrem nas diferentes etapas do processo de cozimento *kraft* (Sixta, 2006).

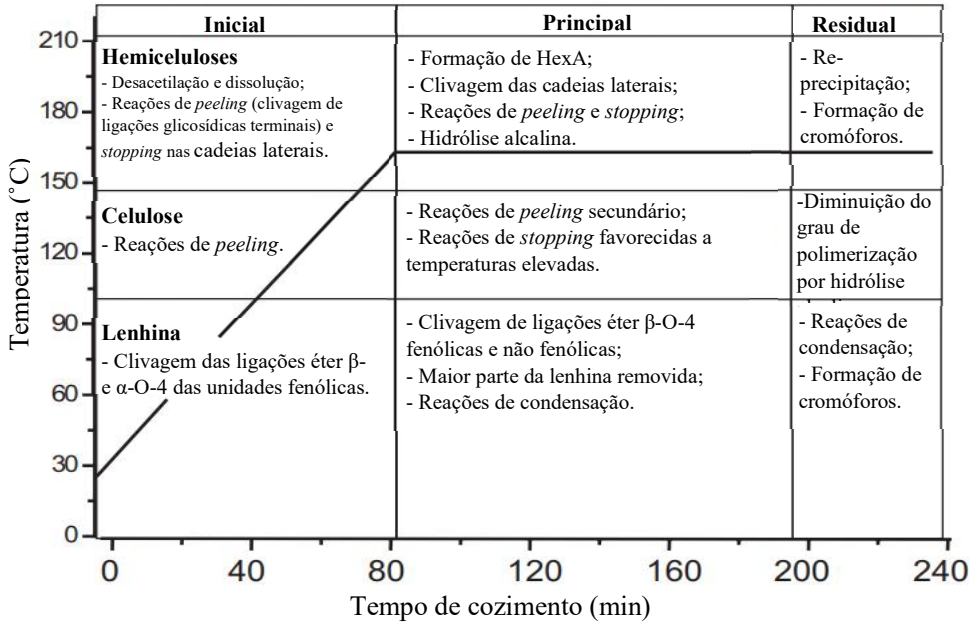


Figura 6 – Fases da deslenhificação e reações dos componentes da madeira (Adaptado de Sixta, 2006).

3.2. Reações com a Lenhina

A ocorrência da despolimerização e consequente dissolução da lenhina no licor de cozimento depende, essencialmente, da clivagem de ligações éter, nomeadamente, as ligações β-O-4 e α-O-4 (Walker, 2006). As ligações carbono-carbono são mais estáveis e, portanto, mais difíceis de sofrer clivagem (Sjöström, 1993). O conjunto destas ligações são quebradas devido à presença dos iões hidroxilo e sulfureto/hidrogenossulfureto e resulta, não só na dissolução da lenhina, como também num aumento da hidrofilicidade da mesma, uma vez que ocorre libertação de grupos hidroxilo fenólicos (Sjöström, 1993; Walker, 2006).

Durante o processo de cozimento, ocorrem diversos tipos de reações, nomeadamente (Sixta, 2006; Sjöström, 1993):

- Ionização de grupos fenólicos;
- Clivagem das ligações éter α-O-4 e β-O-4;
- Libertação de grupos fenólicos livres;
- Ocorrência de reações de condensação;
- Formação de grupos cromóforos.

A reação de clivagem das ligações éter β-arilo, nas estruturas fenólicas livres, envolve em primeiro lugar a formação de um composto intermediário quinóide através do anião fenolato

por eliminação do substituinte (hidróxido, alcóxido ou fenóxido) no carbono α. As reações que se seguem, encontram-se dependentes da presença ou não do anião hidrogenossulfureto. Na presença destes iões, como é o caso do cozimento *kraft* (Figura 7), o intermediário é atacado por adição nucleofílica, ocorrendo a formação de uma estrutura de sulfeto de etileno, com clivagem simultânea da ligação β-éter. A estrutura formada, bem como outros compostos contendo enxofre, são decompostos, levando à formação de moléculas de enxofre. Esta formação de enxofre, justifica a pequena quantidade consumida de sulfureto no licor no processo de cozimento *kraft* (Sjöström, 1993).

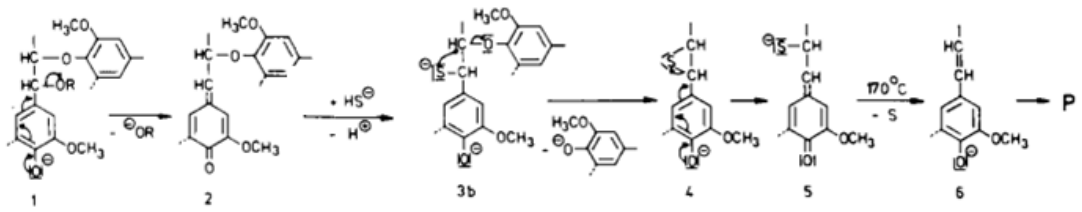


Figura 7 – Clivagem da ligação éter β-arilo em unidades fenólicas durante o processo de cozimento *kraft* (Adaptado de Sjöström, 1993).

Por outro lado, as ligações α-éter, presentes nas estruturas fenólicas, sofrem clivagem em meio básico (Figura 8), ocorrendo, geralmente, libertação de formaldeído. Contudo, somente no caso de estruturas abertas de éter α-arilo, esta reação resulta na fragmentação da lenhina. Em todas as outras estruturas estas ligações são estáveis (Sjöström, 1993).

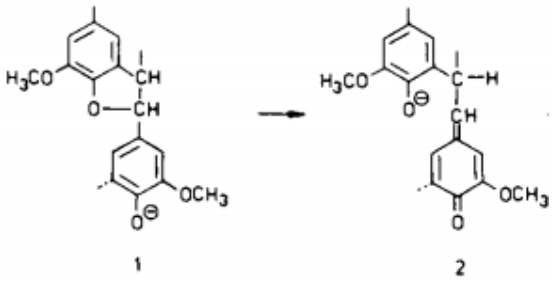


Figura 8 – Clivagem da ligação éter α-arilo em unidades fenólicas em meio básico (Adaptado de Sjöström, 1993).

As ligações éter β-arilo, presentes em estruturas contendo unidades não-fenólicas, são clivadas por iões hidroxilo, tal como representado na Figura 9. Esta reação promove uma deslenhificação eficiente, uma vez que ocorre fragmentação da lenhina com a formação e libertação de novos grupos hidroxilos fenólicos livres (Sjöström, 1993; Walker, 2006).

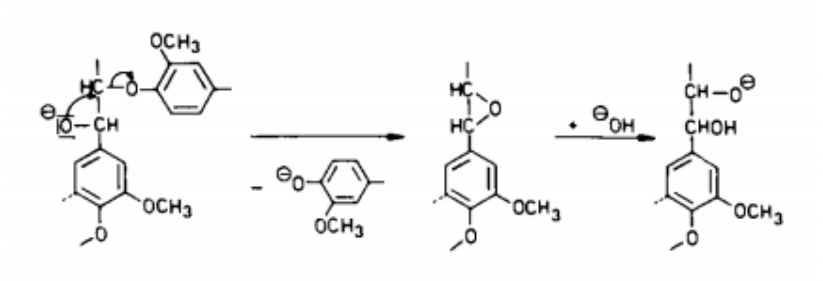


Figura 9 – Clivagem das ligações β-aril-éter em unidades não fenólicas (Sjöström, 1993).

Durante o processo de cozimento *kraft*, são várias as reações conhecidas de condensação que ocorrem. A maior parte deste tipo de reações ocorre na posição C-5 desocupada em unidades fenólicas. Assim este tipo de reações tem maior probabilidade de ocorrência em *softwoods*, uma vez que nas *hardwoods* a lenhina seringílica contem um grupo O-metilo na posição C-5 (Sjöström, 1993; Sixta, 2006). Como resultado das reações de condensação, ocorre a formação de ligações carbono-carbono entre unidades de lenhina, levando a uma dissolução retardada da mesma, dificultando a sua deslenhificação (Sjöström, 1993; Sixta, 2006). Na Figura 10, encontra-se exemplificado uma reação de condensação durante o processo de cozimento *kraft*.

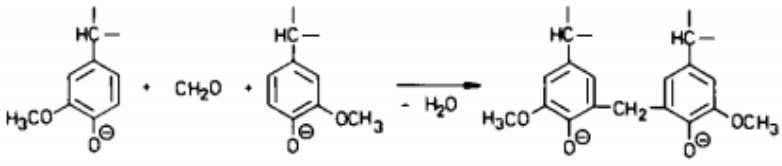


Figura 10 – Exemplo de uma reação de condensação na lenhina do tipo G, durante o processo de cozimento *kraft* (Sjöström, 1993).

A lenhina residual presente nas pastas *kraft* não branqueadas, apresenta um coeficiente de absorção específico mais elevado do que na madeira original, o que indica que a pasta resultante aparenta ser mais escura, em comparação com outros métodos de obtenção de pasta (Sixta, 2006). A razão para este facto pode dever-se à formação de compostos insaturados e altamente conjugados, pela conversão de leucocromóforos em cromóforos por oxidação do ar que pode estar contido na pasta (Sixta, 2006; Sjöström, 1993). A cor das pastas não branqueadas, resulta da presença de estruturas insaturadas, designadas por cromóforos

(Sjöström, 1993). A formação de cromóforos em unidades fenólicas de lenhina encontra-se esquematizado na Figura 11.

A maior parte dos compostos cromóforos presentes na pasta são derivados de lenhina, embora também possam existir alguns associados aos polissacarídeos (Sjöström, 1993).

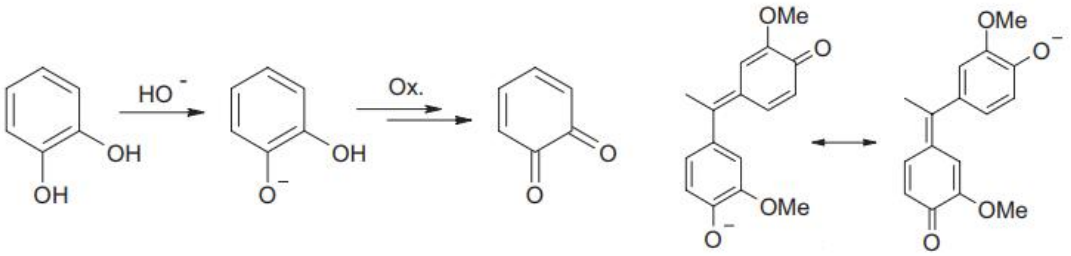


Figura 11 – Formação de cromóforos a partir de subestruturas de lenhina fenólica (Sixta, 2006).

3.3. Reações com os Polissacarídeos

Os polissacarídeos durante o processo de cozimento *kraft*, sob condições alcalinas, sofrem degradação que resulta numa perda de hidratos de carbono considerável (Sjöström, 1993). A reatividade destes, durante o cozimento *kraft*, depende fortemente da sua morfologia, cristalinidade e grau de polimerização. Como já referido anteriormente, a celulose é mais resistente em condições alcalinas, pelo que sofre menos degradação que as hemiceluloses (Sixta, 2006). As reações são complexas, destacando-se as seguintes (Sixta, 2006; Sjöström, 1993):

- Desacetilação a temperaturas inferiores a 70ºC;
- Reações de *peeling* e *stopping* a temperaturas superiores a 80ºC;
- Hidrólise aleatória, também designada por *peeling* secundário, a temperaturas superiores a 140ºC;
- Fragmentações;
- Dissolução das hemiceluloses;
- Eliminação do metanol dos resíduos dos ácidos 4-O-metilglucurónico e formação dos ácidos hexenurónicos;
- Re-adsorção de hemiceluloses na superfície das fibras;
- Formação de cromóforos.

No processo de cozimento *kraft*, devido ao pH elevado no início, os grupos acetilo, presentes nas xilanas em *hardwoods* ou em galactoglucomananas em *softwoods*, podem sofrer hidrólise com o aumento da temperatura (Sixta, 2006; Sjöström, 1993). Produzem-se aniões acetilo, que irão ser responsáveis pelo consumo de uma quantidade considerável de base durante a fase de aquecimento do cozimento *kraft*. Parte das hemiceluloses que sofreram desacetilação são dissolvidas no licor de cozimento. Já na fase final da deslenhificação residual, ocorre uma diminuição da concentração da carga alcalina, levando à re-adsorção das hemiceluloses na superfície da fibra (Sixta, 2006).

A degradação dos hidratos de carbono pode ser dividida em três reações básicas: *peeling* final, *peeling* oxidativo e *peeling* secundário, tal como apresentado na Figura 12 (Sixta, 2006).

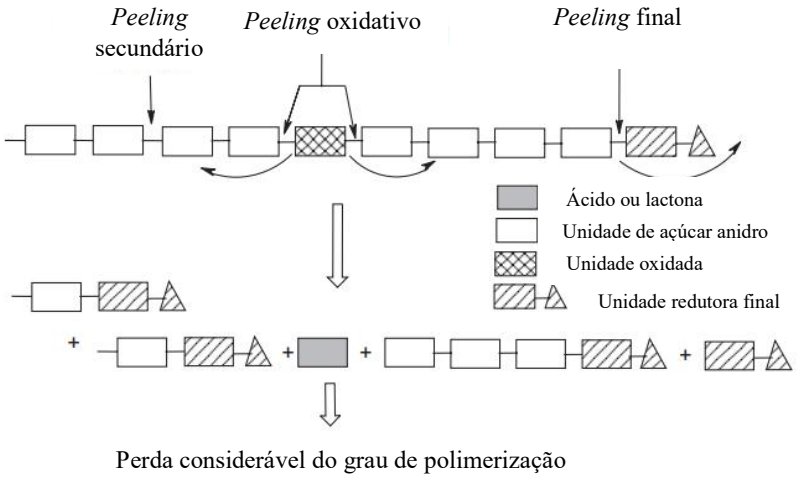


Figura 12 – Esquema modelo da degradação dos polissacarídeos sob condições alcalinas (Adaptado de Sixta, 2006).

A reação de *peeling* final consiste na remoção da unidade terminal de açúcar anidro levando à formação de uma nova extremidade redutora final (Sixta, 2006). Esta reação é terminada por uma reação de *stopping*, também denominada de reação de estabilização do grupo final, que consiste na conversão do grupo final redutor num grupo estável, em condições alcalinas, de ácido carboxílico (Sjöström, 1993).

A temperaturas elevadas, ocorre a clivagem direta da celulose (hidrólise alcalina), levando ao surgimento do *peeling* secundário. A hidrólise alcalina aleatória das ligações glicosídicas, para além de uma perda considerável do grau de polimerização, levam à formação de novos grupos terminais suscetíveis de sofrer degradação, o *peeling* secundário, sendo este o

principal responsável pelas perdas de rendimento durante o processo de cozimento (Sixta, 2006; Sjöström, 1993).

Para além destas reações, também ocorre a formação de ácidos hexenurónicos (HexA), devido à eliminação do grupo metanol nos ácidos 4-O-metilglucurónico presentes na cadeia das xilanas, tal como ilustrado na Figura 13 (Buchert *et al.*, 1995). Esta reação é favorecida a temperaturas e condições alcalinas altas. A formação dos HexA durante o processo de cozimento pode ser responsável pela estabilidade das xilanas, uma vez que previne a ocorrência de reações de *peeling* nas unidades ramificadas. Os HexA formados contribuem para a quantidade total de grupos carboxílicos presentes na pasta e para o índice kappa, uma vez que consomem permanganato de potássio. Tem sido proposto determinar o índice kappa corrigido que elimina a fração que não corresponde a lenhina residual presente nas pastas (Sixta, 2006). Este assunto irá ser abordado com maior detalhe na secção 5.4.2.

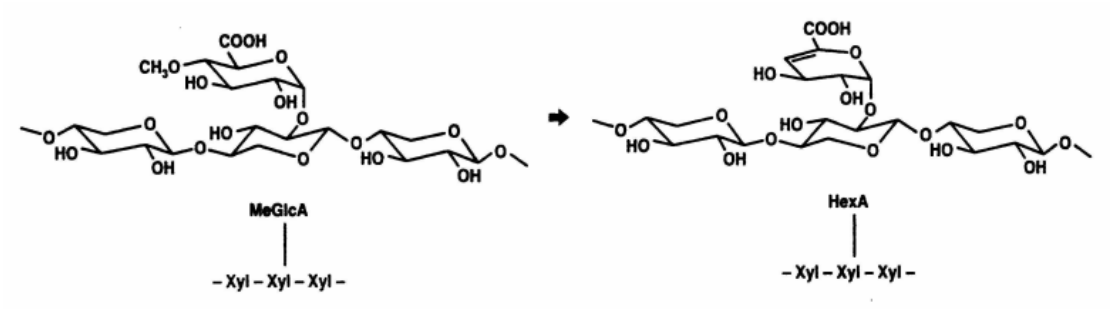


Figura 13 – Formação de HexA durante o processo de cozimento *kraft* (Buchert *et al.*, 1995).

Tal como referido anteriormente, também existe a formação de compostos cromóforos derivados de polissacarídeos. Estes podem ser formados, durante o processo de cozimento *kraft*, através de reações de oxidação sob condições alcalinas. (Figura 14)

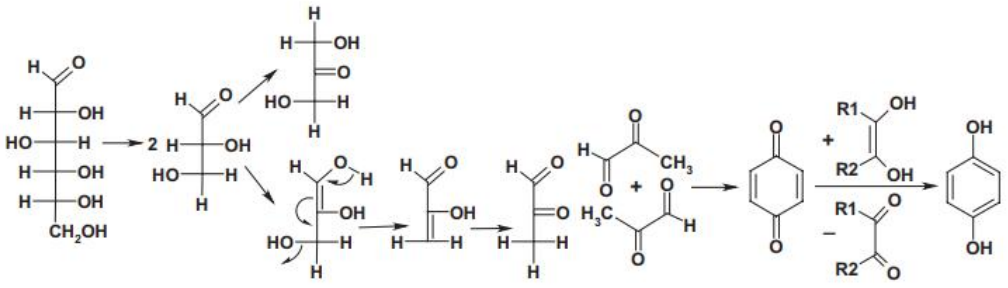


Figura 14 – Formação de cromóforos a partir de hidratos de carbono (Sixta, 2006).

4. Branqueamento de Pastas *Kraft*

No processo de cozimento *kraft* cerca de 92-95% da lenhina presente na madeira é removida (Neto *et al.*, 2002). O processo de cozimento *kraft* não deve ser prolongado, uma vez que se obteria um teor de lenhina mais baixo à custa de uma degradação elevada dos polissacarídeos, levando a uma diminuição do rendimento e das propriedades de resistência das pastas (Sixta, 2006). Assim, para que ocorra a remoção de lenhina residual (bem como ácidos hexenurónicos e extratáveis residuais) e destruição de outros cromóforos entretanto produzidos durante o cozimento, recorre-se a uma sequência de branqueamento (Neto *et al.*, 2002). Com a eliminação e modificação dos compostos referidos, a brancura da pasta obtida é aumentada sendo exigível um nível de brancura elevado quando o uso final do papel é para impressão e escrita. Para além disso, é importante garantir que a brancura obtida seja estável (García Hortal *et al.*, 1984).

Vários são os cromóforos existentes na pasta que podem afetar a branqueabilidade da mesma. A lenhina residual é responsável pela maioria dos compostos cromóforos das pastas *kraft* não branqueadas (Dyer, 2004), nomeadamente a lenhina envolvida nas ligações estáveis dos LCC (complexos lenhina-xilana) as quais afetam a branqueabilidade da pasta (Loureiro, 2012). Para além disso, a existência de extratáveis também têm impacto significativo na cor das pastas, embora no conjunto total de cromóforos existentes a sua contribuição seja provavelmente pequena. Além destes cromóforos provenientes dos compostos originais da madeira, há aqueles formados durante o processo de cozimento: i) derivados da lenhina, tais como, estilbeno quinonas, estruturas o-quinonas, complexos metal-catecol, entre outros (Loureiro, 2012; Sjöström, 1993; Sixta, 2006), como se exemplificou na Figura 11; ii) derivados dos polissacarídeos, exemplificado na Figura 14, ou ainda pela formação dos ácidos hexenurónicos – Figura 13 (Buchert *et al*., 1995; Dyer, 2004; Sixta, 2006). Um estudo efetuado por Loureiro *et al.* (2010) evidenciou ainda que, na pasta *kraft* de eucalipto, a xilana é uma importante fonte de cromóforos.

O branqueamento é definido como um processo químico que promove a remoção de cor das pastas, sendo o seu progresso avaliado através da medição da refletância da luz visível para um comprimento de onda de 457 nm (Brancura ISO). Com a aplicação do branqueamento ocorre uma diminuição da concentração de agentes cromóforos e um aumento consequente da quantidade de luz azul refletida pela folha de pasta, embora esta relação não seja proporcional (Sixta, 2006).

O branqueamento é efetuado como um processo de multiestágios, uma vez que os compostos corados apresentam diferentes reatividades, o que não permite que sejam eliminados de uma só vez numa etapa de branqueamento (García Hortal *et al.*, 1984). O primeiro estágio serve então como estágio de deslenhificação, visto que o objetivo principal é a remoção da maioria da lenhina residual ainda presente na pasta e, não propriamente de branqueamento. Neste estágio inicial, o índice de kappa (IK) servirá como parâmetro de controlo. Nos estágios seguintes, irão ser aplicados reagentes com o objetivo principal de promover o aumento da brancura da pasta. Com a aplicação de várias etapas de branqueamento, intervaladas com lavagem, consegue-se obter uma pasta mais branca com menor degradação de polissacarídeos, uma vez que se colocam pequenas quantidades de reagentes de cada vez (García Hortal *et al.*, 1984).

Os principais tipos de agentes de branqueamento podem ser designados por (García Hortal *et al.*, 1984):

- Oxidantes – cloro, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, clorito de sódio, clorato de sódio, peróxido de hidrogénio, peróxido de sódio, oxigénio e ozono;
- Redutores – hidrosulfito de sódio, hidrosulfito de zinco e boro hidreto de sódio.

Para além dos químicos referidos, também podem ser usados estágios de branqueamento com enzimas e agentes quelantes.

Dependendo do tipo de reagente aplicado, as reações podem ser divididas em nucleofílicas ou eletrofílicas, como o peróxido de hidrogénio ou o dióxido de cloro, respetivamente (Sixta, 2006). Para além disso, as sequências de branqueamento podem ainda ser divididas em ECF (*elemental chlorine free bleaching*) e TCF (*total chlorine free bleaching*), onde a primeira corresponde a uma série de tratamentos oxidativos com pelo menos um estágio de dióxido de cloro, alternados com estágios de extração alcalina, e a segunda diz respeito a sequências com ausência de químicos baseados em cloro, usando para tal químicos oxidantes como oxigénio, peróxido de hidrogénio e ozono (Neto *et al.*, 2002).

Vários são os reagentes químicos usados no processo de branqueamento, cujas principais vantagens e desvantagens se podem resumir como se segue (Dence & Reeve, 1996):

- O uso de cloro no processo de branqueamento leva a oxidação e cloração da lenhina, ou seja, são adicionados átomos de cloro à lenhina. A utilização deste reagente leva a uma deslenhificação efetiva e económica e a uma boa remoção de

partículas, mas é altamente corrosivo e leva à formação de compostos organoclorados (AOX);

- A realização de um estágio de branqueamento com hipoclorito, faz com que a lenhina seja oxidada, descolorida e solubilizada. Este composto apresenta fácil preparação, uso e baixo custo. Por outro lado, pode causar perda da resistência da pasta e pode levar à formação de clorofórmio;
- O dióxido de cloro é muito utilizado na indústria porque, para além de oxidar, descolorar e solubilizar a lenhina na presença de pequenas quantidades de cloro, permite alcançar elevada brancura sem grande degradação da celulose e consequente perda da resistência da pasta; além disso, permite um bom branqueamento das partículas/impurezas. Contudo, apresenta os seguintes inconvenientes: a sua preparação tem de ser efetuada no local, o custo é elevado, origina alguns compostos organoclorados e é altamente corrosivo;
- A utilização de um estágio de oxigénio leva a oxidação e solubilização da lenhina. Este reagente químico apresenta um baixo custo, origina efluentes livres de cloro passível de ser recuperado, mas requere equipamentos caros quando usado em larga escala e potencia a perda de resistência da pasta;
- Quando se aplica peróxido de hidrogénio como estágio de branqueamento, a lenhina sofre oxidação e é descolorada. Este composto é de fácil manuseamento e apresenta um baixo custo capital. Por outro lado, apresenta como desvantagens o elevado custo, ter baixa eficiência no branqueamento de partículas/impurezas e poder causar perda da resistência da pasta;
- O ozono, provoca a oxidação, solubilização e descoloração da lenhina, é efetivo e origina efluentes recuperáveis. Por outro lado, deve ser preparado no local, apresenta custo elevado, é pouco seletivo e leva à perda de resistência da pasta;
- Ao contrário dos reagentes químicos atrás mencionados, o hidrosulfito é um redutor, uma vez que provoca a redução e descoloração da lenhina em pastas com alto rendimento, é de fácil manuseamento e apresenta baixo custo capital. No entanto, decompõe-se com facilidade e o ganho de brancura é limitado;
- Quanto ao uso de enzimas, nomeadamente as xilanases, estas irão catalisar a hidrólise parcial das xilanas facilitando a remoção da lenhina. As enzimas são de fácil uso, mas têm eficácia limitada e apresentam alto custo;

- O hidróxido de sódio, usado nos estágios de extração alcalina, hidrolisa as clorolenhinas e solubiliza a lenhina. Este composto é seletivo e económico, mas provoca o escurecimento da pasta;
- Por último, os compostos quelantes, como o EDTA (ácido etilenodiaminatetra-acético) ou DTPA (ácido dietilenotriaminapenta-acético), atuam na remoção dos iões metálicos, aumentando a seletividade e eficiência do peróxido de hidrogénio. Apresentam como desvantagens o custo elevado. São normalmente utilizados nas sequências que usam reagentes à base de oxigénio, tal como, oxigénio, ozono e peróxido de hidrogénio (Carvalho, 1999; Dence & Reeve, 1996).

Para o uso de uma determinada sequência, seja ela qual for, é sempre necessário otimizar determinadas variáveis de operação (tais como tempo, temperatura, pH, consistência e carga de reagente inicial e residual) de modo a obter uma pasta com a brancura desejada e com perda mínima de rendimento e de resistência (Carvalho, 1999).

Como, no desenvolvimento deste trabalho, foi utilizado um estágio enzimático com xilanases, uma extração alcalina com hidróxido de sódio reforçada com peróxido de hidrogénio e um estágio com dióxido de cloro, estas etapas serão abordadas em maior detalhe nas secções seguintes.

4.1. Tratamento Enzimático

Os efluentes produzidos durante o branqueamento de pastas *kraft* são os que mais contribuem para a poluição das águas residuais da indústria da pasta e do papel. Assim, estes efluentes necessitam de ser tratados antes da sua descarga. Contudo, devido à elevada carga orgânica que contêm, a presença de compostos organoclorados tóxicos colocam a estação de tratamento de água residuais em sobrecarga (Fillat *et al.*, 2011; Bajpai & Bajpai, 1992).

Tendo em conta este cenário, recorreu-se à introdução de novas tecnologias de branqueamento, como alternativa às sequências baseadas em cloro elementar, as denominadas sequências ECF (elemental chlorine free) ou TCF (total chlorine free) (Quintana *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2014; Dence & Reeve, 1996). Estas novas tecnologias, surgem assim para eliminar o uso de cloro elementar e as preocupações ambientais associadas (Bajpai & Bajpai, 1992). Por exemplo, os efluentes provenientes de torres onde se usam reagentes à base de oxigénio, não são corrosivos, permitindo assim que os mesmos possam ser recirculados no processo (Bajpai & Bajpai, 1992). Por outro lado, algumas das estratégias inovadoras de branqueamento

baseadas no uso de oxigénio ou ozono, não permitem a eliminação completa do uso de dióxido de cloro para a obtenção de pastas de elevada brancura, devido à sua menor eficácia.

A abordagem biotecnológica para o branqueamento de pasta surge como uma alternativa, visto que podem ser usadas enzimas como impulsionadoras da brancura (e não propriamente como agentes de branqueamento), que irão aumentar a eficiência de branqueamento nas etapas seguintes (Sixta, 2006; Singh *et al.*, 2014; Bajpai & Bajpai, 1992; Fillat *el al.*, 2011).

São diversas as enzimas que podem ser utilizadas nos processos de pasta e papel, tal como é apresentado na Tabela 2. A função apresentada para cada uma das enzimas serve apenas como um exemplo, uma vez que cada uma das enzimas pode ser aplicada para diversos fins.

Tabela 2 – Exemplo de enzimas utilizadas nos processos de pasta e papel (Adaptado de Novozymes, 2014).

Enzima	Exemplo de função
Amilases	Modificação do amido para uso no revestimento do papel
Celulases	Redução de energia de refinação
Pectinases	Controlo de lixo aniónico (formação da folha)
Xilanases	Impulsionador de brancura de pastas

As xilanases pertencem a uma das três grandes classes de enzimas modificadoras da fibra, as hemicelulases, e um dos mecanismos proposto é a sua capacidade de hidrolisar as xilanas presentes na superfície das fibras, tornando assim mais fácil o acesso aos reagentes químicos (Fillat *et al.*, 2011; Novozymes, 2014). Para além das xilanases, existem outras enzimas capazes de modificar a fibra, como ilustrado na Figura 15.

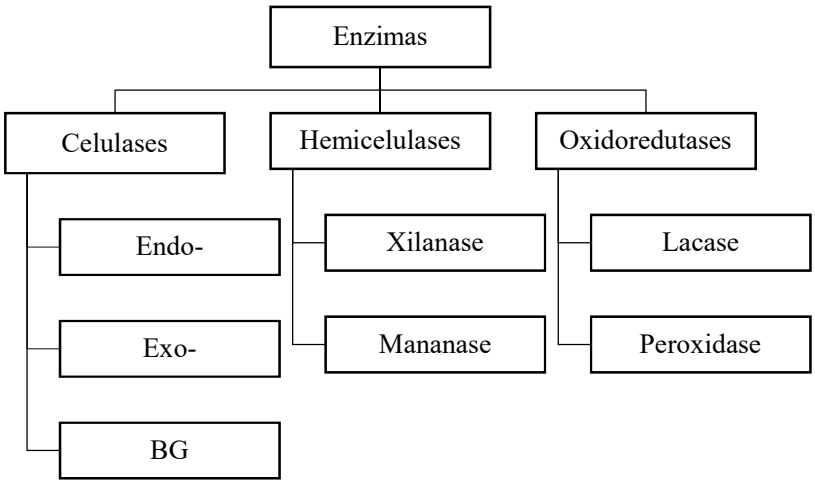


Figura 15 – Três principais classes de enzimas modificadoras da fibra (Adaptado de Novozymes, 2014).

4.1.1. Xilanases

O uso das xilanases no branqueamento de pasta foi em primeiro lugar mencionado por Viikari *et al*. (1986). Os primeiros testes a nível industrial, foram feitos em 1989 na Finlândia e o uso de xilanase no processo de branqueamento tornou-se uma realidade desde 1991. No entanto, só a partir de 1993, é que o processo começou a ganhar uma aceitação maior no Canadá e na Europa. Este rápido desenvolvimento pode ser explicado pelo facto do pré-branqueamento com xilanase exigir muito pouco ou nenhum investimento de capital para operar, as mudanças no processo serem em geral mínimas, ajudar a reduzir a poluição causada pelo processo de branqueamento e a sua incorporação ser fácil em muitas sequências de branqueamento em pastas ECF e TCF, entre outros fatores (Bajpai & Bajpai, 1997).

As enzimas comercialmente utilizadas no branqueamento de pastas são hemicelulases, que, como o próprio nome indica, irão afetar seletivamente uma fração hemicelulítica das pastas (Bajpai & Bajpai, 1997). O conceito de branqueamento enzimático é baseado na remoção limitada de hemiceluloses, em pastas *kraft* pelas hemicelulases, aumentando a capacidade de extração da lenhina nos estágios subsequentes de branqueamento químico (Viikari *et al.* 1994).

Vários são os fornecedores de xilanases por todo o mundo, como por exemplo, AB Enzymes, Genencor, Novozymes, Iogen Bio-Products (adquirida em 2013 pela Novozymes), Diversa, Oji Paper, entre outros (Bajpai, 2012).

O mecanismo de atuação das xilanases ainda não é completamente compreendido, mas é conhecido que a enzima não funciona como um agente de branqueamento da pasta, mas sim como agente modificador da estrutura de alguns dos seus componentes (Beg *et al.*, 2001). Uma hipótese indicada é a das xilanases despolimerizarem a xilana precipitada na superfície das fibras. O rompimento da cadeia de xilana e consequente solubilização de porções contendo ligações lenhina-xilana (Figura 16), induz a remoção de parte da lenhina residual e facilita o acesso aos reagentes químicos utilizados no branqueamento no estágio subsequente (Beg *et al.*, 2001; Subramaniyan & Prema, 2002; Polizeli *et al.*, 2005; Bajpai & Bajpai, 1997; Sharma, 2017; Walia *et al.*, 2017).

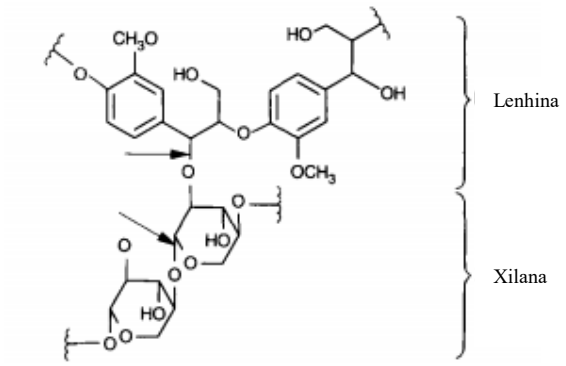


Figura 16 – Possível estrutura do complexo lenhina-xilana em pastas *kraft* não branqueadas (Adaptado de *Bajpai & Bajpai, 1997*).

A aplicação da xilanase no processo de branqueamento (estágio X) resulta numa redução da necessidade de produtos químicos oxidantes em 20 a 40%, nomeadamente no uso de uma menor dosagem de dióxido de cloro, em concentrações menores de compostos organoclorados nos efluentes podendo ocorrer uma remoção seletiva de mais de 20% da xilana da pasta (Beg *et al.*, 2001, López *et al.*, 2017, Sharma *et al.*, 2013). É de salientar que a remoção da xilana, tem sempre associada uma perda de rendimento, sendo esta a principal desvantagem do uso da xilanase.

Devido à heterogeneidade e natureza química complexa da xilana, seria necessário um complexo enzimático e não apenas uma enzima para ocorrer a hidrólise completa da xilana (Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005; Kapilan & Arasaratnam, 2017; Walia *et al.*, 2017; Sharma, 2017). Esse complexo enzimático é geralmente constituído por endo-1,4-β-endoxilanase, β-xilosidase, α-L-arabino-furanosidase, α-glucuronidase, acetilxilana esterase, feruloil esterase e p-cumaroil esterase (Figura 17). Excetuando as duas primeiras, os grupos laterais presentes na xilana são libertados pelas restantes (Beg *et al.*, 2001, Subramaniyan & Prema, 2002; Polizeli *et al.*, 2005; Sharma & Kumar, 2013).

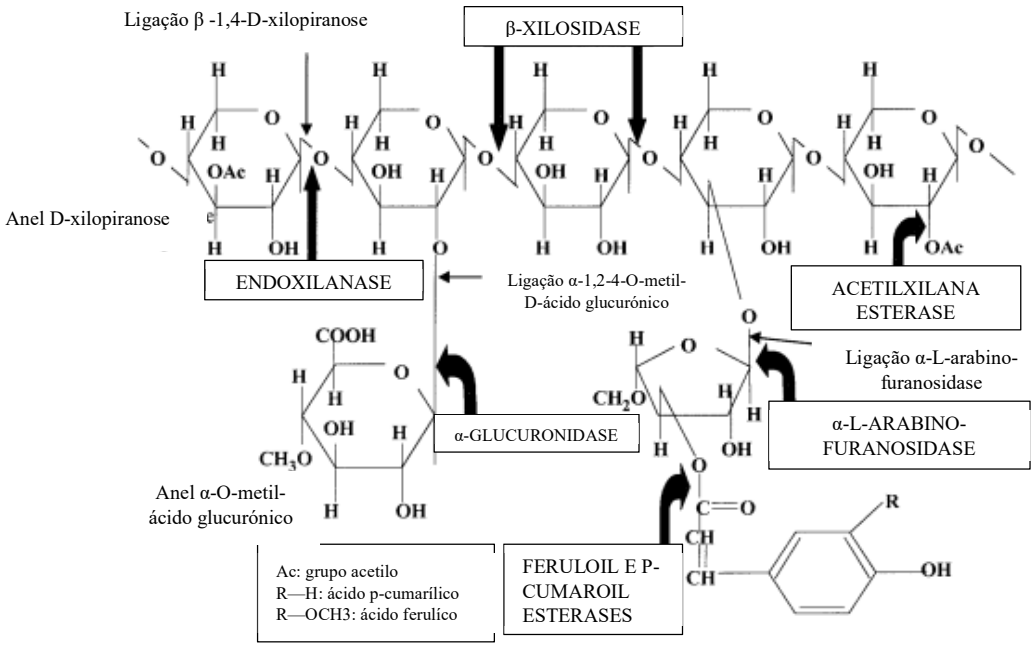


Figura 17 – Complexo enzimático necessário para a hidrólise completa da xilana (Adaptado de Beg *et al.*, 2001).

Todas estas enzimas têm de atuar de forma cooperativa para a hidrólise completa da xilana se dar. No entanto, não sendo esse o objectivo do branqueamento (pois ter-se-ia uma perda acentuada de rendimento e um menor potencial papeleiro), as principais enzimas envolvidas são a endo-1,4-β-endoxilanase e a β-xilosidase. A endo-1,4-β-xilanase despolimeriza as xilanas de forma aleatória, produzindo xiloligossacarídeos e a 1,4-β-xilosidase hidrolisa esses oligossacarídeos, produzindo xilose.

As xilanases podem ser produzidas por fungos, bactérias, leveduras, algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos, insetos, sementes, etc (Bajpai, 2012; Subramaniyan & Prema, 2002; Beg *et al.*, 2001). Elas diferem no seu modo de atuação, sendo que o pH ótimo das xilanases bacterianas é normalmente maior que o das xilanases fúngicas. Para além disso, o complexo enzimático das xilanases produzidas por fungos (que não contém só xilanases) é menos seletivo que os complexos produzidos por bactérias, uma vez que podem apresentar uma maior atividade celulolítica, tornando-as menos interessantes e adequadas para a indústria da pasta e do papel (Beg *et al.*, 2001). De facto, a enzima a selecionar não deve ter uma atividade celulolítica apreciável, pois a celulose seria degradada e, consequente, haveria perda de viscosidade e implicações económicas (Sharma & Kumar, 2013).

Para a escolha de um microrganismo produtor de xilanase, vários são os critérios essenciais a considerar. Além do desejado efeito biobranqueador, a quantidade produzida do complexo enzimático deve ser suficientemente elevada e a tecnologia de aplicação da xilanase deve ser compatível com uma fábrica de pasta e papel.

Outros fatores importantes a ter em conta, incluem pH, temperatura, dosagem e dispersão enzimática, consistência e tempo de reação. O pH ideal para o tratamento com xilanase varia de enzima para enzima. Geralmente, as xilanases de origem fúngica são eficazes dentro do intervalo de pH ácido de 4 a 6 e as xilanases de origem bacteriana são eficazes no intervalo de pH mais amplo de 5 a 9. No que diz respeito à temperatura ótima para a ação da xilanase varia entre 35 e 60°C. Para a obtenção de melhores resultados do uso de enzimas, a dosagem da enzima e a consistência da pasta devem ser otimizadas em cada caso para obter uma dispersão efetiva da enzima. Em geral, a dose ideal situa-se na gama de 2 a 5 IU/g (unidade internacional por grama de pasta em base seca), e a consistência entre 5 a 10%. O efeito do tratamento enzimático faz-se sentir após 1-2h de tratamento (Beg *et al.*, 2001; Bajpai & Bajpai, 1997).

Para além dos demais fatores já apresentados, as operações efetuadas na fábrica também afetam o desempenho das enzimas, nomeadamente, a matéria prima utilizada, o processo de cozimento e a sequência de branqueamento (Bajpai & Bajpai, 1997).

Vários estudos têm sido feitos ao longo dos anos em relação à aplicação de xilanases no branqueamento de pasta *kraft*, encontrando-se alguns deles apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de operação do estágio enzimática (X) e sequências estudadas.

Referência	Enzima/ código	Condições de operação de X	Sequência estudada
PASTA *KRAFT* DE EUCALIPTO GLOBULUS NACIONAL			
Sousa *et al.*, 2015	Pulpzyme HC	0,5 AUX*/g odp; 60ºC; pH=8; 2h	DED**X** DED**X**D DED**X**P DEDD**X** DEDP**X**
Ferraz, 2013	EN2 (Xilanase)	0.08% odp; 70ºC; pH=6; t=1h	DED**X** DED**X**D DED**X**P
	EN3 (Xilanase)	0.085% odp; 70 ºC; pH=7; 1h	
	EN4 (Xilanase)	0.15% odp; 50ºC; pH=5; 1h	
	EN5 (Xilanase)	0.05% odp; 70ºC; pH=7; 1h	
Esteves, 2013	EI1 (Xilanase)	0.011%odp; 60ºC; pH=6; 1h	DED**X** DED**X**D DED**X**P DE**X** DE**X**D
	EN4 (Xilanase)	0.15% odp; 50ºC; pH=5; 1h	
	EN5 (Xilanase)	0.05% odp; 70ºC; pH= 7; 1h	
Pinheiro, 2014	Xilanase 1	200 mL/tAD; 70ºC; pH=7; 30 min	**X**DE
	Xilanase 2	900 mL/tAD; 65-85ºC; pH=7-9;30 min	
Sintra, 2015	Xilanase	0.067/t odp; 88ºC; pH=8; 1h	O**X**DE
Fonseca, 2017	Xilanase *Serzym* 90 e NS-51121	70g/t odp ou 100g/t odp; 60ºC; pH=4.5; 45 min	**X**DE
PASTA *KRAFT* DE EUCALIPTO			
Cheng *et al.*, 2013	Xilanase produzida de *Streptomyces griseorubens LH-3* com 135 U/mL de atividade enzimática	20 IU**/g odp; 65ºC; pH=6; 1h	**X** **X**P
Comlekcioglu *et al.*, 2014	Xilanase: xynA16	1-4 U***/g; 50ºC; pH=6; 3h	**X** **X**OEP
Gupta *et al.*, 2014	Xilanase	15 IU**/g; 70ºC; pH=9; 3h	**X**DE
Meng *et al.*, 2015	Xilanase livre de celulase com 11000 IU/g de atividade enzimática	50 IU**/g odp; 50ºC; pH=6.5; 1h	**X** **X**DED
Gangwar *et al.*, 2015	Xilanase: Optimase CX 72 L	0.1-0.5 kg/tp; 55ºC; pH=8	**X** **X**DEDD
Silva *et al.*, 2016	Xilanase	25 U***/g; 50ºC; pH=5.5; 2h	**X** Controlo
Wu *et al.*, 2017	Xilanase	20 IU**/ g odp; pH=8; 60ºC; 1h	**X**P P
PASTA *KRAFT* DE HARDWOOD			
Kumar *et al.*, 2017	*Xylanase from Bacillus amyloliquefaciens*	20 IU**/g; 60ºC; pH=9; 3h	**X** Controlo

*AUX – *activity xylanase unit*; **IU – unidade internacional; ***U – unidade de atividade enzimática

Em todos os estudos mencionados na Tabela 3, verificou-se um aumento de brancura, quando se aplicava o estágio enzimático. Também se constatou que a estabilidade de brancura era aumentada (Sousa *et al.*, 2015; Ferraz, 2013; Esteves, 2013; Pinheiro, 2014; Sintra, 2015).

O estágio enzimático pode ser colocado em diversos locais da sequência de branqueamento, no início, no final ou como penúltimo estágio de branqueamento. Contudo, ao avaliar o efeito do posicionamento do estágio enzimático em pastas DED, Sousa (2015) concluiu que o estágio X na penúltima posição (sequências DEDXD e DEDXP) mostrou ser mais vantajoso que na última (sequências DEDDX e DEDPX, respetivamente) em termos de ganho de brancura e estabilidade da brancura nas pastas finais.

Ferraz (2013) aplicou diferentes enzimas em pastas DED, verificando que as condições ótimas de atuação variavam, obtendo diferentes resultados no que diz respeito à brancura alcançada e estabilidade de brancura no final da sequência. O desempenho da enzima é bastante afetado pelas condições do meio pelo que a aplicação do tratamento enzimático não deve ser afastada das condições ótimas (Pinheiro, 2014). Esteves (2013) empregou o estágio enzimático em pastas DED e pastas DE, verificando que não era apropriado eliminar um estágio de dióxido de cloro com a utilização de um estágio X na sequência.

O estudo efetuado por Pinheiro (2014) revelou que a origem da pasta influencia a branqueabilidade das mesmas, uma vez que várias pastas cruas de *E. globulus*, igualmente deslinhificadas, foram recolhidas em diferentes unidades industriais. As diferentes brancuras obtidas após a sequência XDE, foram atribuídas às diferenças no processo *kraft* utilizado em cada unidade fabril. Comlekcioglu *et al.* (2014), para além da pasta de eucalipto, aplicou o estágio X em pasta de palha de trigo e em pasta de pinheiro, verificando que o efeito do branqueamento da xilanase varia de acordo com o tipo de material lenhocelulósico.

Quando o estágio enzimático é aplicado, verifica-se em diversos estudos que ocorre uma diminuição do IK relativamente à pasta de controlo (Meng *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017). Noutros trabalhos, observa-se também uma diminuição dos HexA (15.2%) e da viscosidade (3%), quando comparado com o controlo (Meng *et al.*, 2015). Cheng *et al.* (2013) constatou que quando a enzima utilizada é livre de celulases, não ocorre grandes alterações na viscosidade, uma vez que não ocorre degradação significativa da celulose. Para além disso, verificou também que quando se pretende atingir o mesmo nível de brancura, ocorre uma diminuição dos reagentes de branqueamento, o que leva, por consequência, a um aumento do rendimento e viscosidade, visto que quando se utilizam menores quantidades de reagentes químicos ocorre uma menor degradação da celulose.

Gangwar *et al.* (2015), atingiu poupanças significativas nos reagentes químicos utilizados (14.6-17.6% e 18.4-23.1% de dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio, respetivamente), quando aplicado o estágio enzimático em comparação com a pasta de controlo de modo a atingir o mesmo grau de brancura.

Para além dos estudos apresentados na Tabela 3 onde a aplicação da xilanase foi feita em pastas de eucalipto, existem muitos outros estudos em diferentes tipos de fibras tais como pasta de sisal, algodão, palha de arroz, acácia, bagaço, pasta de papel de jornal, fibra de banana, entre outras (Valenzuela *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2012; Immanuel *et al.*, 2017; Thakur *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Nathan *et al.*, 2017; Baral *et al.*, 2017).

4.1.2. Lacases

A lacase aparece como outra enzima potencial candidata ao branqueamento, uma vez que decompõe seletivamente a lenhina residual presente na fibra crua (Bajpai *et al.*, 2006).

As lacases pertencem à família de enzimas oxidases, uma vez que reduzem o oxigénio elementar a água, numa etapa que envolve quatro eletrões, efetuando, simultaneamente, a oxidação de subunidades fenólicas presentes na lenhina. No entanto, esta enzima não é capaz de atuar sozinha. Para a lacase ser efetiva na deslenhificação da pasta, tem de atuar conjuntamente com um mediador, que consiste numa pequena molécula redox que atua como transportadora de eletrões entre a lenhina e a enzima (Bajpai *et al.*, 2006; Eugenio *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2013). Este mediador é necessário, uma vez que a molécula de lacase é demasiado grande para penetrar na parede celular secundária e oxidar diretamente a lenhina. O mediador oxidado, atua diretamente na lenhina, permitindo uma deslenhificação eficaz. Os mediadores de lacase mais comuns, são o 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e o 2,2'-azinobis-(3-etilbenzitiazolina-6)-sulfónico (ABTS), mas ambos apresentam um custo excessivo. Assim, para que esta enzima possa ser incorporada na indústria da pasta e do papel tem-se como necessidade imediata o uso de mediadores de lacase baratos e com fácil disponibilidade (Thakur *et al.*, 2012).

Com o uso desta enzima, prevê-se uma diminuição do impacto ambiental, eliminando o uso de dióxido de cloro e a formação de compostos organoclorados, um investimento de capital menor, a utilização de um sistema seguro de remoção seletiva de lenhina e rendimentos de celulose melhorados (Bajpai *et al.*, 2006). Vários estudos já foram feitos usando este sistema de mediação com lacase. Para além disso, já foi usado em conjunto com a xilanase, obtendo

melhores resultados do que quando se aplica xilanase sozinha, no que diz respeito ao aumento de brancura e diminuição de IK (Gupta *et al.*, 2014; Maalej-Achouri *et al.*, 2012).

4.2. Dióxido de Cloro

O dióxido de cloro é um forte agente oxidante que reage com a lenhina presente na pasta sem provocar grande degradação da celulose ou hemicelulose, tratando-se assim de um reagente químico de branqueamento muito seletivo (Bajpai, 2012; Sjöström, 1993; Sixta, 2006). Trata-se de um eletrófilo que ataca, predominantemente, os anéis aromáticos com grupos hidroxilo fenólicos livres (Sjöström, 1993). Este reagente químico é eficiente quer na deslenhificação, quer no aumento de brancura da pasta, uma vez que atua na redução ou eliminação da lenhina residual e na redução de agentes cromóforos presentes na pasta (Bajpai, 2012). No entanto, sabe-se que este tipo de oxidação (somente com dióxido de cloro) não consegue explicar a eficácia da deslenhificação. No decorrer da reação entre o dióxido de cloro e a lenhina presente na pasta, tanto os iões clorito como o ácido hipocloroso podem ser formados, tal como apresentado na Figura 18. Estes reagentes poderão contribuir para a eliminação da lenhina residual, justificando assim a eficácia de deslenhificação em estágios com dióxido de cloro (Sjöström, 1993).

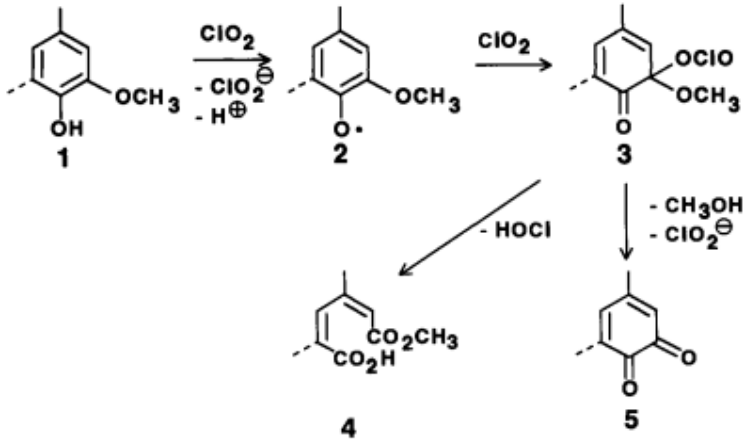


Figura 18 – Exemplos de reações da lenhina residual com dióxido de cloro (Sjöström, 1993).

No estágio de dióxido de cloro, uma estrutura de grupos fenólicos livres (1) dá origem à formação de um radical (2), que irá ser oxidado num intermediário (3). Este intermediário irá sofrer clivagem, dando origem a uma estrutura de ácido mucónico (4) ou numa estrutura de o-

quinona (5), com a simultânea formação de iões clorito (ClO_2^-) e ácido hipocloroso (HOCl) (Figura 18).

O ácido hipocloroso e os iões clorito, quando presentes em conjunto, dão origem a cloratos e a cloretos (Equação 1). O clorato, por sua vez, não irá reagir com a pasta e contribui para uma perda na eficiência de branqueamento (Bajpai, 2012).

$$HOCl+ClO_2^- \leftrightarrow ClO_3^- + Cl^- + H^+ \quad (1)$$

A formação do clorato é proporcional ao consumo de dióxido de cloro, mas é fortemente dependente do pH empregue no branqueamento. Em condições alcalinas, o dióxido de cloro irá ser transformado em iões clorito e cloratos (Equação 2). Assim, estas condições não levarão a uma alta taxa de deslenhificação (Suess, 2010).

$$2ClO_2+OH^- \rightarrow ClO_2^- + ClO_3^- + H_2O \quad (2)$$

Em condições ácidas, o dióxido de cloro gera clorato de maneira semelhante, quando o ácido hipocloroso estiver presente, tal como apresentado na Equação 1 (Suess, 2010). A quantidade de ácido hipocloroso aumenta quando o pH da reação diminui durante o processo de branqueamento com dióxido de cloro, o que leva a um aumento significativo da eficiência de branqueamento, uma vez que, ocorre regeneração de dióxido de cloro através da oxidação do clorito. A perda do poder de oxidação, devido à formação de clorito, pode ser recuperada através da oxidação de clorito com o ácido hipocloroso (Equação 3). Esta reação, é o passo chave para o melhor desempenho de branqueamento com o dióxido de cloro, em condições ácidas (Sixta, 2006). O ião clorito pode ainda ser reoxidado a dióxido de cloro segundo a reação apresentada na Equação 4. (Sjöström, 1993)

$$2ClO_2^- + HOCl \rightarrow 2ClO_2 + Cl^- + OH^- \quad (3)$$

$$2ClO_2^- + Cl_2 \leftrightarrow 2ClO_2 + 2Cl^- \quad (4)$$

O ácido hipocloroso, também está em equilíbrio com o cloro (Equação 5), o que promove também o aumento da eficiência de branqueamento, uma vez que o cloro atua como agente despolimerizador da lenhina. Contudo, esta reação, contribui para a formação de compostos organoclorados (Sixta, 2006).

$$HOCl + H^+ + Cl^- \leftrightarrow Cl_2 + H_2O \quad (5)$$

Quando se usa um estágio de dióxido de cloro para deslenhificação, é importante a manipulação das condições de reação de forma a minimizar a formação de cloratos e de cloro livre ou ácido hipocloroso, melhorando assim a eficiência da deslenhificação e minimizando a formação de compostos organoclorados. Isto implica que o pH seja baixo quando o dióxido de cloro é usado como primeiro estágio de dióxido (D_0), preferencialmente entre 2,5 e 3,5. Por outro lado, quando for utilizado como segundo estágio de dióxido (D_1) o pH deve situar-se entre 3 e 4,5 (Suess, 2010).

Para além da reação com a lenhina, o dióxido de carbono reage com os ácidos hexenurónicos, formando ácidos dicarboxílicos clorados e não clorados (Figura 19) (Vuorinen *et al.*,1997).

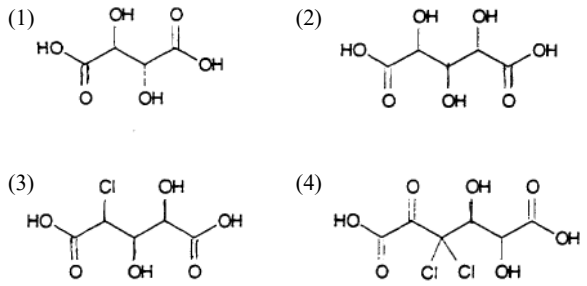


Figura 19 – Ácidos dicarboxílicos clorados (1 e 2) e não clorados (3 e 4) formados durante a reação do dióxido de cloro com os ácidos hexenurónicos (Vuorinen *et al.*, 1997).

4.3. Extração Alcalina

O estágio oxidativo da lenhina com dióxido de cloro forma uma grande quantidade de lenhina de baixo peso molecular dividida em compostos facilmente solúveis em água. No entanto, o seu peso molecular não é baixo o suficiente para que ocorra a dissolução em meio ácido. Pelo contrário, obtém-se um maior número de compostos mais solúveis em água sob condições alcalinas (Suess, 2010). Os compostos fenólicos e ácidos carboxílicos dissolvem-se como sais de sódio, pelo que a adição de um estágio alcalino irá promover a remoção da lenhina. Quanto maior for a lenhina removida nestes estágios menores serão as quantidades de oxidantes nos estágios subsequentes. Então, é habitual que a seguir a um estágio com dióxido de cloro seja aplicado um estágio de extração alcalina, sendo esta feita geralmente com hidróxido de

sódio (Suess, 2010). O estágio de extração alcalina elimina também uma parte significativa de extratáveis residuais, que contribuem para a cor das pastas (Carvalho, 1999).

A variável pH é muito importante neste estágio. Após o estágio de extração o pH deve ser superior 10,5, de modo a assegurar a ionização dos grupos fenólicos da lenhina (Suess, 2010).

A carga de hidróxido de sódio a ser aplicada depende do grau de oxidação no estágio anterior, ou seja, da quantidade de dióxido de cloro aplicada no estágio D_0 e do IK inicial da pasta. Para pastas com um elevado valor de IK, a carga total de dióxido de cloro a aplicar em toda a sequência pode ser muito elevada, pelo que, de modo a diminuir esta necessidade, adicionam-se reagentes químicos ao estágio de extração. O oxigénio e o peróxido de hidrogénio destacam-se como sendo os mais utilizados (Suess, 2010).

No presente trabalho, o estágio de extração alcalina foi reforçado com peróxido de hidrogénio, que será explicado com maior detalhe na secção seguinte.

4.3.1. Extração Alcalina Reforçada com Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio é o segundo reagente químico mais utilizado como reforço em estágios de extração alcalina (Suess, 2010).

Em meio alcalino, o peróxido de hidrogénio encontra-se em equilíbrio com o anião hidroperóxido (Equação 6), composto ativo nas reações de branqueamento.

$$H_2O_2 + OH^- \leftrightarrow H_2O + HOO^- \qquad (6)$$

O anião hidroperóxido atua como um intermediário nucleófilo reagindo com as estruturas quinonas (Figura 20), sendo responsável pela oxidação de compostos cromóforos presentes na lenhina através da clivagem das suas cadeias laterais (Suess, 2010; Sixta, 2006; Dence & Reeve, 1996). Os compostos oxidados resultantes são mais hidrofílicos e solúveis, facilitando assim a extração (Suess, 2010).

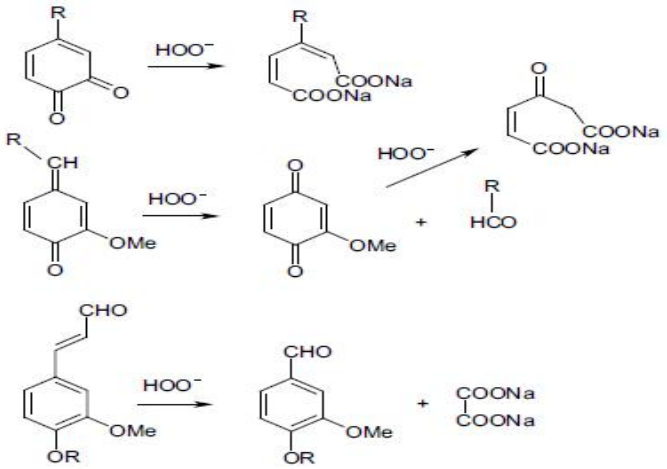


Figura 20 – Reações do peróxido de hidrogénio com a lenhina sob condições alcalinas (Suess, 2010).

Por sua vez, o anião hidroperóxido reage com o peróxido de hidrogénio, tal como apresentado na Equação 7 (Sixta, 2006).

$$HOO^- + H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2 + OH^- \quad (7)$$

O peróxido de hidrogênio, em condições alcalinas, decompõe-se em radicais, tal como apresentado nas Equações 8 a 11, sendo este processo acelerado na presença de metais de transição (Dence & Reeve, 1996).

$$H_2O_2 + HO_2^- \rightarrow OH^\cdot + O_2^{\cdot-} + H_2O \quad (8)$$

$$O_2^{\cdot-} + OH^\cdot \rightarrow O_2 + OH^- \quad (9)$$

$$H_2O_2 + M^{n+} \rightarrow M^{(n+1)+} + OH^\cdot + OH^- \quad (10)$$

$$HO_2^- + M^{(n+1)+} \rightarrow M^{n+} + O_2^{\cdot-} + H^+ \quad (11)$$

Uma das grandes desvantagens apresentadas para o peróxido de hidrogénio, é a sua grande instabilidade, uma vez que este pode decompor-se em água e oxigénio (Equação 12) (Suess, 2010).

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2 \quad (12)$$

No que diz respeito à temperatura, temperaturas elevadas, acima de 110ºC levam a uma deslenhificação aumentada (Dence & Reeve, 1996). No entanto, nesta gama de temperaturas,

ocorre a clivagem homolítica do peróxido de hidrogénio nos radicais hidroxilo (Equação 13), que leva a uma diminuição da qualidade da pasta que é detectada na determinação da viscosidade (Suess, 2010). Assim, de modo a obter uma diminuição significativa do IK, uma temperatura de 90ºC já é suficiente (Dence & Reeve, 1996).

$$H_2O_2 \rightarrow 2OH^{\cdot} \qquad (13)$$

Com o tratamento com peróxido de hidrogénio, observa-se um aumento da brancura. A deslenhificação neste estágio, deve-se em grande parte ao resultado da ação dos radicais produzidos, uma vez que, a temperaturas moderadas e condições alcalinas, o efeito deslenhificante do peróxido de hidrogénio é limitado (Sixta, 2006).

5. Materiais e Métodos

Nesta secção, encontra-se apresentada a matéria prima utilizada, bem como as metodologias adotadas para a elaboração do presente trabalho. Este foi dividido em diferentes etapas, nomeadamente determinação da atividade enzimática, tratamento enzimático de pasta crua, tratamento enzimático seguido de branqueamentos químicos e caracterização das pastas obtidas.

A metodologia adotada, para a sequência de branqueamento, encontra-se esquematizada na Figura 21, onde primeiramente se começou por determinar as condições ótimas de aplicação de enzima na pasta crua, de seguida aplicou-se a sequência XDE$_P$ e cDE$_P$ (correspondente aos controlos), de modo a ser possível fazer uma comparação das vantagens e desvantagens da aplicação do estágio enzimático como primeiro estágio na sequência de branqueamento.

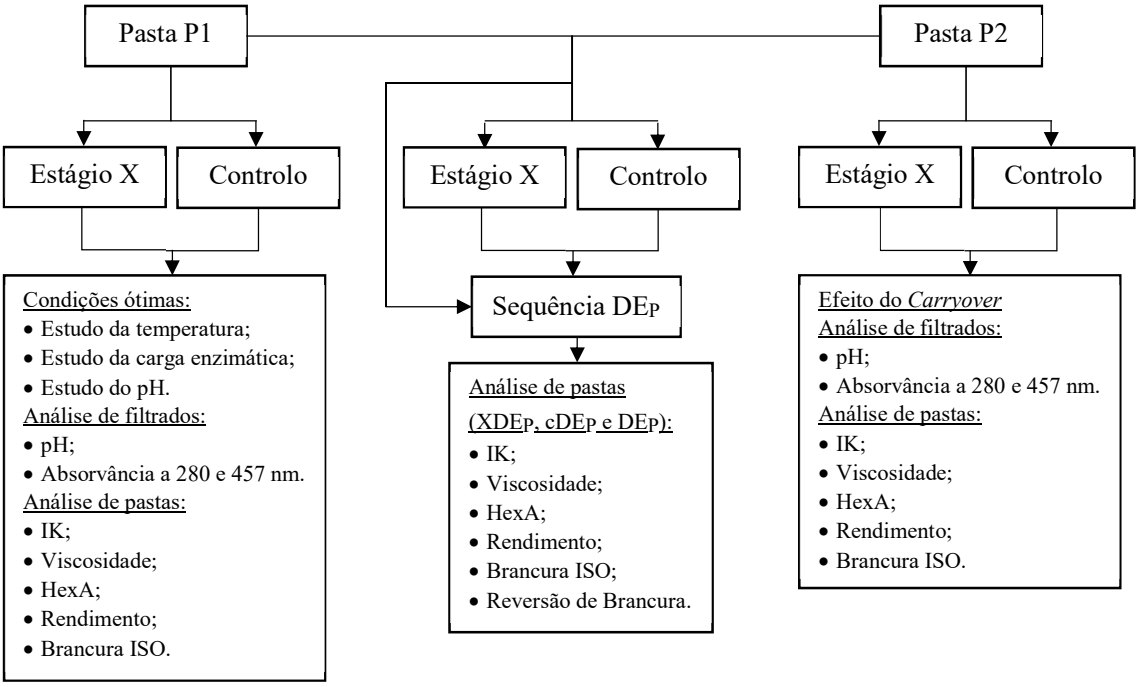


Figura 21 – Metodologia experimental.

5.1. Matéria Prima

A pasta que serviu de base para a realização dos variados ensaios, foi recolhida numa unidade industrial portuguesa e corresponde a uma pasta *kraft* crua de *Eucalyptus globulus*. Em dois momentos (8 de março e 22 de maio), foram recolhidas duas amostras de pastas distintas

(Pasta P1 e Pasta P2) em dois pontos diferentes do processo, tal como ilustrado no diagrama de processo simplificado apresentado no Anexo I. Os pontos de recolha das pastas tiveram em conta a possível aplicação do estágio enzimático como primeiro estágio de branqueamento na unidade industrial. Para se manter estável ao longo do período de tempo em que decorreu os ensaios laboratoriais, a pasta P1 foi sujeita a uma lavagem intensiva e guardada em ambiente refrigerado. A pasta P2, após recolha, foi dividida em duas partes: uma sofreu lavagem intensiva, enquanto a outra permaneceu na forma "suja", sendo mais à frente designada "Pasta P2 não lavada".

A pasta P1 foi a que serviu de base para a obtenção das condições mais adequadas para a aplicação do estágio X. Para isso, estudou-se o efeito do pH, temperatura e carga enzimática. O tempo foi mantido constante de modo a diminuir o número de ensaios a realizar no período útil disponível para a Dissertação. Ainda nesta pasta, foi aplicada a sequência XDE_P que permitiu, por comparação com as respectivas pastas de controlo (cDE_P), estimar a poupança de dióxido de cloro associada à aplicação do estágio X.

No que diz respeito à pasta P2, foi utilizada com o principal objetivo de verificar o efeito do *carryover* na pasta. Tanto na pasta P2 lavada como na P2 não lavada foi aplicada a sequência de branqueamento XDE_P e respetivos controlos, para posterior comparação.

5.2. Determinação da Atividade Enzimática

Neste trabalho foi usada uma endo-β-1,4-xylanase (GH11) com proveniência da *Novozymes*, na forma líquida. A atividade enzimática da xilanase utilizada foi determinada segundo a metodologia apresentada por Ghose & Bisaria (1987). O procedimento encontra-se explicado de forma detalhada no Anexo II.1. Para este, os reagentes utilizados foram o ácido dinitrosalicílico (DNS), a solução tampão (McIlvaine), xilana de aveia e xilose.

A atividade enzimática corresponde à quantidade de xilose libertada proveniente da xilana em resultado da ação enzimática durante 60 minutos. Esta é representada por unidades de atividade por mL de solução enzimática, ou seja, a quantidade de xilose equivalente libertada, em μmol, por minuto e por mL de solução enzimática.

Em primeiro lugar, procedeu-se à elaboração da curva de calibração, que permitiu, à posteriori, relacionar a absorvância lida no espetrofotómetro com a quantidade de xilose libertada, utilizando para tal o reagente DNS. De seguida, procedeu-se à diluição da enzima em tampão McIlvaine (pH=7.2), admitindo tratar-se de uma enzima com origem bacteriana, e fez-se a determinação da atividade enzimática a uma temperatura de 37ºC.

5.3. Branqueamentos

Com o objetivo de estudar os efeitos da aplicação de um tratamento enzimático no início da sequência de branqueamento, começou-se por recolher as condições da Torre de armazenamento de pasta da Unidade Industrial e determinar as condições operatórias mais extremas em que seria possível obter atividade enzimática significativa. Assim, foram estudadas diferentes condições de temperatura, pH e carga enzimática para a Pasta P1 e analisados os filtrados residuais obtidos. Posteriormente, e com as condições consideradas mais adequadas, o estágio enzimático foi seguido de uma sequência DE_P, quer para pastas com enzimas ou quer para as pastas controlo, de modo a determinar a poupança de dióxido de cloro obtida com a aplicação da xilanase. A sequência DE_P foi aplicada para as diferentes três pastas estudadas, Pasta P1, Pasta P2 e Pasta P2 não lavada ("suja"). No caso da Pasta P2, foi assim possível verificar os efeitos do *carryover*.

Para todos os estágios de branqueamento, foi considerada uma consistência de 10%, onde se utilizou 20 g de pasta seca por ensaio, e foram realizados em sacos de polietileno, onde a pasta e os reagentes utilizados foram misturados e homogeneizados à mão (para os estágios enzimáticos a pasta e os reagentes foram pré-aquecidos antes de serem misturados). De seguida, os sacos foram introduzidos no banho à temperatura desejada e com agitação vai e vém durante o tempo necessário para cada estágio. No final do ensaio, as pastas foram filtradas usando um filtro de placa porosa (para o cálculo posterior do rendimento), os filtrados residuais foram armazenados para posterior análise e as pastas foram lavadas usando 3 L de água destilada para cada uma. Após lavagem, as pastas foram armazenadas no frigorífico em sacos de polietileno para posterior caracterização, ou para prosseguir com a sequência de branqueamento.

A preparação dos ensaios, no que diz respeito à determinação da massa de reagentes a pesar, preparação do tampão utilizado nos estágios enzimáticos, teor de secura, determinação da concentração dos reagentes a usar, bem como o procedimento experimental para os diferentes estágios de branqueamento, encontram-se nos Anexos II.2 e II.3, respetivamente.

5.3.1. Tratamento Enzimático

O tratamento enzimático foi dividido em duas partes: i) tratamentos enzimáticos preliminares para estudar o efeito das condições operatórias no desempenho da enzima e ii) tratamentos enzimáticos seguidos da sequência DE_P. Em paralelo com os tratamentos enzimáticos foram sempre efetuados controlos, isto é, foi efectuado um tratamento nas mesmas

condições que o estágio enzimático, mas sem adição de enzima, de modo a serem eliminados os efeitos do pH e da lavagem posterior.

Todas as condições utilizadas, encontram-se apresentadas na Tabela 4, tendo sido escolhidas de acordo com as condições possíveis na torre de armazenamento da fábrica, bem como outros estudos realizados anteriormente (Pinheiro, 2014; Sintra, 2015). O cálculo da carga enzimática em unidades U/g o.d.p. encontra-se apresentado no Anexo II.4.

Os filtrados obtidos após estes estágios, foram guardados em recipientes para posterior medição de pH e análise qualitativa da remoção de lenhina e de outros cromóforos, através de da medição da absorvância para os comprimentos de onda 280 nm e 457 nm, respetivamente. (Ajao *et al.*, 2017; Rosenau *et al.*, 2008)

Para a realização do tratamento enzimático, foi necessário proceder a uma diluição prévia da enzima, uma vez que a enzima utilizada apresentava elevada atividade e as dosagens aplicadas foram baixas. Assim, para as cargas de 35 e 50 g/tAD e de 70 e 100 g/tAD, foram aplicados os fatores de diluição de 1:10000 e 1:5000, respetivamente.

Tabela 4 – Condições utilizadas nos estágios enzimáticos.

Pasta	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	pH	Carga Enzimática (g/tAD)	Carga Enzimática (U/g o.d.p.)
P1 lavada	60	60; 65; 75; 85	7;8;9;10	35; 50; 70; 100	1,0; 1,9; 2,6; 3,7
P2 lavada	60	65	9	50; 100	1,9; 3,7
P2 não lavada	60	65	9	50; 100	1,9; 3,7

5.3.2. Dióxido de Cloro

Também no estágio de dióxido de cloro, para a pasta P1, foram aplicadas diferentes cargas de dióxido de cloro de modo a traçar as curvas de branqueamento e verificar se a evolução da brancura formava um patamar. Estas curvas permitiram escolher qual a carga de dióxido mais adequada a aplicar. É importante que a carga de dióxido de cloro aplicada não seja demasiado alta (na zona de patamar), uma vez que se for usada em excesso pode encobrir o efeito do tratamento enzimático. Para as pastas controlo, foram aplicadas 3 cargas distintas de ClO_2, para posterior análise relativamente à poupança deste mesmo reagente, quando aplicado um tratamento enzimático. As condições apresentadas na Tabela 5 foram também escolhidas tendo em conta os valores fabris. Antes de se aplicar este estágio, a concentração do reagente deve ser determinada, tal como descrito no Anexo II.2.4.

No final do estágio com dióxido de cloro, os filtrados residuais foram guardados para medição posterior de pH e da concentração residual de ClO_2 presente, segundo a metodologia apresentada no Anexo II.5.1.

Tabela 5 – Condições utilizadas nos estágios de branqueamento com dióxido de cloro.

Pasta	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Carga ClO_2 (gCl_2/L)
P1 – Crua			2,5; 2,9; 3,3; 3,7; 4,1
Pasta – X	30	65	3,3
Pasta - Controlo			3,3; 3,7; 4,1

5.3.3. Extração Alcalina com Hidróxido de Sódio Reforçada com Peróxido de Hidrogénio

Para a realização do estágio de extração alcalina, foi necessário previamente preparar a solução de NaOH a utilizar, bem como determinar as concentrações dos reagentes NaOH e H_2O_2, seguindo a metodologia apresentada no Anexo II.2.5. e II.2.6., respetivamente.

Mais uma vez, as condições utilizadas são similares às aplicadas a nível industrial e encontram-se apresentadas na Tabela 6. Para a Pasta P1, foram utilizadas diferentes cargas de NaOH e H_2O_2, de modo a que, no final da sequência DE_P, a pasta tivesse características semelhantes à da unidade industrial.

No final dos estágios de extração alcalina as pastas foram filtradas, e os filtrados residuais foram guardados para análise do pH e determinação das concentrações residuais dos reagentes, tal como descrito no Anexo II.5.2. e II.5.3, para o H_2O_2 e NaOH, respetivamente.

Tabela 6 – Condições utilizadas nos estágios de branqueamento de extração alcalina (E_P).

Pasta	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Carga NaOH (g/L)	Carga H_2O_2 (g/L)
P1 – D			1,3; 1,5; 1,7	0,3; 0,45
Pasta – XD	80	75	1,5	0,45
Pasta - cD			1,5	0,45

5.4. Caracterização das Pastas

De modo a avaliar a evolução da aplicação dos diferentes estágios de branqueamento mencionados anteriormente, é necessário efetuar uma caracterização química das pastas. Neste trabalho, as variáveis estudadas foram o teor de lenhina residual (IK e IK corrigido), teor de ácidos hexenurónicos, viscosidade intrínseca, brancura e estabilidade da brancura.

Todos os valores apresentados correspondem à média das diversas medições com o respetivo desvio padrão. Os valores de desvio padrão que se encontram apresentados dentro de parênteses dizem respeito ao desvio associado à metodologia adotada (isto é, determinações repetidas na mesma amostra de pasta), enquanto os valores apresentados com a ausência de parênteses correspondem ao desvio de réplicas efetuadas (i.e. ensaios de branqueamento feitos nas mesmas condições operatórias mas em 2 tomas diferentes da amostra original de pasta crua). De notar que estas réplicas apenas foram efetuadas nas sequências XDE_P e respetivas pastas de controlo.

5.4.1. Índice Kappa (IK)

Com a aplicação de diferentes estágios de branqueamento ocorre a deslenhificação da pasta. Assim, torna-se importante acompanhar a evolução do teor de lenhina residual nas pastas resultantes desses mesmos estágios.

A determinação do índice de Kappa (IK) permite o acompanhamento da evolução da lenhina residual (e do grau de deslenhificação das pastas), bem como da maior ou menor facilidade do seu branqueamento. É importante referir que não existe uma relação inequívoca entre o IK e o conteúdo da lenhina, uma vez que esta relação depende da espécie de madeira e do processo de deslenhificação.

A determinação do IK, foi realizado segundo a metodologia descrita na norma portuguesa NP 3186 (1995) e encontra-se detalhada no Anexo II.6.1. Neste método a pasta desintegrada é levada a reagir com uma quantidade específica de permanganato de potássio durante um certo período. O permanganato de potássio irá reagir com o material oxidável presente nas pastas. A reação ocorrida encontra-se apresentada na Equação 14 (norma ISO 302:2004). No entanto, esta metodologia não distingue entre o material oxidável presente na lenhina residual e outras estruturas suscetíveis de sofrer oxidação, como os ácidos hexenurónicos (HexA) (Li & Gellerstedt, 1997).

$$\text{Lenhina residual+outros compostos oxidáveis+}MnO_4^- + 4H^+ \rightarrow \text{lenhina oxidada+}$$
$$\text{+outros compostos oxidados+ }MnO_4^-\text{em excesso+ }MnO_2 + 2H_2O \quad (14)$$

Assim, o Índice Kappa é obtido através do número de mililitros de uma solução de permanganato de potássio (0,1N) consumidos por grama de pasta absolutamente seca, sob condições normalizadas. A quantidade de permanganato a utilizar deve ser tal que leve a um consumo de cerca de 50% do adicionado. O permanganato que não é consumido, ao fim de exatamente 10 minutos de reação com a suspensão de pasta, é determinado por iodometria.

Como o teor de lenhina presente nas pastas semibranqueadas (DE_P) é baixo, este parâmetro designa-se por índice Micro-Kappa (IK inferior a 5).

5.4.2. Ácidos Hexenurónicos (HexA)

A existência de HexA nas pastas provocas efeitos prejudiciais ao processo de branqueamento, devido à sua estrutura insaturada (Figura 13). Os HexA irão reagir com alguns químicos de branqueamento, aumentando indesejavelmente o seu consumo. Para além disso, a presença de HexA, não dificulta apenas a branqueabilidade das pastas, como também aumenta a reversão de brancura (Pedroso & Carvalho, 2003).

Os HexA são grupos que contribuem para o IK da pasta, uma vez que consomem, assim como a lenhina, parte do permanganato de potássio usado para a sua determinação (Pedroso & Carvalho, 2003; Shatalov, A. & Pereira, H., 2009). Assim, é importante quantificar os HexA ao longo do estudo. A sua quantificação é baseada na hidrólise dos HexA com uma solução de cloreto de mercúrio/acetato de sódio combinado com espectroscopia UV do hidrolisado. A quantidade de HexA é obtida através da Equação 15, onde A_{260} e A_{290} são as absorvâncias a 260 nm e 290 nm, respetivamente; V é o volume de hidrolisado (mL); $m_{pasta\ seca}$ é a massa de pasta seca utilizada para o ensaio e 0,287 é o fator de calibração (Pedroso & Carvalho, 2003).

$$C_{HexA}\left(\frac{\text{mmol}}{\text{kg de pasta}}\right) = 0.287\,\frac{(A_{260}-1.2A_{290})V}{m_{pasta\ seca}} \quad (15)$$

Com o conhecimento desta concentração é possível determinar o valor de IK corrigido (IK_{corr}) que corresponde apenas ao teor de lenhina residual verdadeiro presente na pasta após remover a contribuição dos HexA para o IK - Equação 16 ou 17 (Pedroso & Carvalho, 2003).

$$IK = 5.3(\text{Lenhina Total}) + 0.09C_{HexA} \quad (16)$$
$$IK_{corr} = IK - 0.09C_{HexA} \quad (17)$$

A metodologia detalhada da quantificação do teor de ácidos hexenurónicos encontra-se apresentada no Anexo II.6.2.

5.4.3. Viscosidade Intrínseca

A viscosidade da pasta está relacionada com o grau de polimerização dos componentes poliméricos presentes na mesma, através da equação de Mark-Houwink, Equação 18 (Dence & Reeve, 1996).

$$[\eta]=KM^{a} \qquad (18)$$

A celulose é o principal elemento estrutural presente na pasta e tem o maior peso molecular, pelo que a viscosidade da pasta é considerada proporcional ao comprimento da cadeia de celulose. A sua monitorização é importante uma vez que o potencial papeleiro, nomeadamente a resistência mecânica da folha de papel, está relacionado com este parâmetro. É também frequentemente usado como critério de seletividade tanto do cozimento como do branqueamento (Dence & Reeve, 1996).

Através de métodos como os mencionados nas normas Scan-CM 15:88 e ISO 5351, é possível determinar a viscosidade intrínseca da pasta. Neste trabalho foi usada a norma SCAN-CM 15:88. O procedimento detalhado encontra-se no Anexo II.6.3. É determinada através da comparação do tempo de escoamento de um determinado volume de solução de pasta celulósica, num viscosímetro capilar, com o tempo de escoamento do solvente puro. O solvente utilizado é o Cuprietilenodiamina (CED).

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 para cada uma destas operações.

5.4.4. Brancura ISO

A Brancura ISO define-se como sendo a refletância da luz visível nas folhas, quando sobre elas se faz incidir um feixe de luz azul monocromático, para um comprimento de onda de 457 nm. Para a medição da Brancura ISO foram preparadas folhas segundo a norma ISO 3688, de modo a produzir duas folhas de ensaio com gramagem de 200g/m^2. A sua metodologia encontra-se descrita no Anexo II.6.4. Este parâmetro foi determinado num espectrofotómetro

L&W Elrepho (Modelo 071), disponibilizado pelo RAIZ (Eixo, Aveiro), sendo efetuadas oito medições de brancura, quatro em cada folha produzida.

5.4.5. Estabilidade de Brancura / Reversão de Brancura

A estabilidade de brancura de pastas químicas branqueadas no armazenamento é por vezes fraca, causando inúmeras queixas por parte dos clientes aos fornecedores. Normalmente, a perda de brancura ocorre durante o transporte ou quando armazenado numa pilha de papel. Estas perdas de brancuras podem também ser denominadas por reversão de brancura ou envelhecimento (Suess, 2010). A reversão da brancura pode então dever-se a dois processos (Dence & Reeve, 1996):

- Descoloração térmica oxidativa causada pelo armazenamento prolongado à temperatura ambiente;
- Descoloração fotoquímica oxidativa causada pela exposição à luz do dia.

Quanto maior for a quantidade de lenhina removida (i.e., menor quantidade de lenhina residual presente na pasta), maior será a estabilidade de brancura (Suess, 2010). Também o processo de branqueamento aplicado pode influenciar a estabilidade de brancura, principalmente os estágios finais de branqueamento (Suess, 2010; Loureiro, 2012; El-Sakhawy, 2005; Eiras *et al.*, 2008). Por outro lado, é geralmente aceite que uma maior reversão de brancura pode dever-se a uma maior quantidade de ácidos hexenurónicos presentes (Silva *et al.*, 2011; Suess, 2010; Loureiro, 2012). No entanto, em muitos outros estudos, tal facto não foi confirmado (Loureiro *et al.*, 2010; Eiras *et al.*, 2008), uma vez que a introdução de um estágio final com peróxido de hidrogénio alcalino (P) em vez do estágio de dióxido de cloro (D) no branqueamento do tipo ECF, melhora a estabilidade de brancura das pastas *kraft* branqueadas de eucalipto, apesar da maior quantidade de HexA residual na sua composição (Loureiro, 2012). Isto pode ser justificado pelo facto de o estágio P promover a remoção de estruturas 2-hidroxi-(1,4) benzoquinona (estrutura identificada em vários cromóforos) e o estágio D promover a formação de estruturas quinonas (Loureiro, 2012; Suess, 2010). A vantagem do uso de um tratamento enzimático na redução da reversão de brancura, tem sido associada à remoção de HexA das pastas, embora apenas uma parte destes possa ser acessível à degradação enzimática (Simeonova *et al.*, 2007; Loureiro, 2012). A remoção de lenhina residual ligada às xilanas é outra possível contribuição.

A reversão da brancura pode ser efetuada por diversos métodos, podendo ser dada pela diferença do valor da brancura antes e após o processo de envelhecimento acelerado. Esses métodos diferem entre si em diferentes parâmetros, nomeadamente nível de humidade, tempo de armazenamento e temperatura aplicados. Um desses métodos é a reversão a húmido, onde as folhas de pasta são envelhecidas durante uma hora sob a acção de vapor de água produzido numa panela com água a ferver i.e 100ºC e 100% humidade (Suess, 2010). Em geral, o envelhecimento por via húmida é considerado o mais confiável para medir e prever a estabilidade de brancura de pastas *kraft*, uma vez que durante os processos de secagem, transporte e armazenamento, as pastas estão sujeitas a condições de temperatura e humidade elevadas (Loureiro, 2012).

Uma vez que a brancura não nos permite obter uma relação direta com os cromóforos presentes na pasta, a reversão é dada, geralmente, em valores de PC number (Equação 19), que está diretamente relacionado com o teor de grupos cromóforos presentes na pasta (Suess, 2010; Dence & Reeve, 1996).

$$\text{P.C. } number = 100\left\{\left(\frac{k}{s}\right)_{\text{após reversão}} - \left(\frac{k}{s}\right)_{\text{antes da reversão}}\right\} \qquad (19)$$

A razão da absorção específica (k) com a dispersão específica (s) é dada pela relação ilustrada na Equação 20 (Suess, 2010; Dence & Reeve, 1996), onde R é a refletância obtida para um comprimento de onda de 457 nm, também denominada brancura ISO (%):

$$\left(\frac{k}{s}\right) = \frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty} \qquad (20)$$

Se a dispersão específica, s, permanecer constante durante o processo de envelhecimento, k/s pode ser usado como medida da quantidade de grupos cromóforos presentes na pasta (Suess, 2010; Dence & Reeve, 1996).

A reversão de brancura foi obtida através de um processo a húmido segundo a norma TAPPI 260, onde as folhas foram sujeitas a um ambiente de 100% de humidade e 100ºC durante uma hora. De seguida foram secas com ventilação, entre 2h30 e 4h numa sala condicionada (23 ± 1ºC, 50 ± 2% de humidade). Depois de secas foram prensadas e mediu-se a Brancura ISO novamente.

6. Apresentação e Discussão de Resultados

O principal objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho de uma xilanase comercial no tratamento de uma pasta *kraft* crua de eucalipto quando este é aplicado como primeiro estágio de uma sequência de branqueamento (estágio X). Este capítulo de apresentação dos resultados obtidos e sua discussão, encontra-se dividido em subsecções, entre elas, a determinação da atividade enzimática, a caracterização das pastas cruas, o desempenho da enzima em diferentes condições operatórias e a aplicação de uma sequência DE, antes e após o estágio X, de modo a comparar os efeitos da aplicação da enzima nos ganhos de brancura, na remoção de lenhina, na remoção de ácidos hexenurónicos, na viscosidade e na estabilidade de brancura. Todos os resultados encontram-se compilados e apresentados no Anexo III.

6.1. Determinação da Atividade Enzimática

A solução enzimática utilizada no presente trabalho foi fornecida sem o conhecimento da sua atividade. Assim, o primeiro passo foi proceder à sua determinação – Tabela 7 – recorrendo ao método proposto por Ghose & Bisaria (1987). É de salientar que a enzima foi considerada como sendo de origem bacteriana, pelo que a atividade enzimática foi determinada a um pH de 7,2 e utilizou-se como substrato xilana de *oat spelts.*

Tabela 7 – Atividade enzimática da Xilanase.

Enzima	Atividade Enzimática (U/mL)
Xilanase	36090 (±5123)

Para o cálculo da atividade enzimática foi necessário recorrer a uma curva padrão da atividade da xilanase, disponibilizada por Ghose & Bisaria (1987). Para além disso, foi também necessário elaborar uma curva de calibração, usando uma solução padrão de xilose. Ambas as curvas encontram-se apresentadas no Anexo III.1.

6.2. Caracterização das Pastas Cruas

As pastas utilizadas para o presente trabalho, foram recolhidas em dois momentos distintos na unidade fabril. Após a sua receção no DEQ foram caracterizadas em termos de IK,

viscosidade, HexA e Brancura, encontrando-se os seus valores apresentados na Tabela 8. É de referir que não está apresentada a reversão de brancura pelo facto do vapor de água usado no procedimento funcionar como "lavagem", eliminando alguns dos compostos cromóforos presentes numa pasta "castanha" e assim provocar um aumento de brancura, em vez da sua diminuição, como é habitual.

Tabela 8 – Caracterização das pastas cruas utilizadas.

Pasta	IK	Viscosidade (mL/g)	HexA (mmol/kg)	Brancura ISO (%)
P1 (lavada)	15,0 (±0,2)	1244 (±11)	52,5 (±0,5)	38,5 (±0,0)
P2 (lavada)	13,3 (±0,2)	1163 (±1)	48,6 (±0,6)	38,8 (±0,1)
***P2* não lavada**	*15,4* (±0,3)	*1172* (±40)	*54,7* (±3,8)	*38,3* (±0,1)

É de salientar que se caracterizou a pasta P2 não lavada (sem lavagem adicional em laboratório), o que não é correto segundo as normas, que requerem uma lavagem prévia das pastas para a determinação dos diferentes parâmetros. Contudo, optou-se por fazê-lo na pasta não lavada de modo a observar o efeito do *carryover* no valor dos diferentes parâmetros, principalmente em IK e HexA.

As pastas utilizadas, embora sujeitas a uma lavagem intensiva, foram recolhidas em diferentes períodos temporais, pelo que a diferença nas variáveis medidas se deve à própria variabilidade intrínseca da unidade fabril.

6.3. Desempenho da Enzima em Diferentes Condições Operatórias

O desempenho das enzimas é afetado pelas condições operatórias aplicadas. Assim, na pasta crua (P1), efetuaram-se diferentes ensaios, variando a carga de enzima aplicada, o pH e a temperatura. Assumiu-se o tempo com um valor fixo e igual a 60 minutos, tendo em conta a realidade fabril da torre de armazenamento (60-80 minutos) onde eventualmente pudesse ser aplicado o estágio X, bem como os resultados obtidos noutro estudo efetuado no DEQ onde se analisou o efeito do tempo no desempenho de uma xilanase (Esteves, 2013).

Inicialmente, começou-se por usar duas temperaturas, dentro da gama observada na torre de armazenamento, 60 e 65ºC, para duas cargas enzimáticas distintas, 70 e 100 g/tAD, a diferentes pH - Tabela 9. Nestas condições verifica-se que para a temperatura mais elevada se obtém um maior ganho de brancura e perda de IK quando se aplica a enzima, relativamente à pasta crua. No entanto, as diferenças não são muito notórias, uma vez que, normalmente o erro associado a cada uma destas propriedades é de 0,50 unidades. A perda de IK com a aplicação da xilanase demonstra a sua atuação, uma vez que esta provoca o rompimento da cadeia de

xilana, permitindo a remoção/dissolução de fragmentos i) contendo ligações do complexo lenhina-xilana (LCC) (Sharma, 2017) e/ou ii) contendo grupos de ácidos hexenurónicos (Meng *et al.*, 2015), sendo estes os dois componentes que contribuem para o IK.

Tabela 9 – Valores obtidos para IK e Brancura ISO apenas com a aplicação de tratamento enzimático na pasta P1.

Pasta	Temperatura (ºC)	pH	IK			Brancura ISO (%)		
			Controlo	70 g/tAD	100 g/tAD	Controlo	70 g/tAD	100 g/tAD
P1	60	6,9	14,1 (±0,2)	12,8 (±0,2)	12,5 (±0,0)	39,3 (±0,2)	41,5 (±0,1)	41,9 (±0,1)
		7,6	14,6 (±0,2)	13,3 (±0,1)	13,2 (±0,2)	39,1 (±0,1)	41,8 (±0,1)	42,1 (±0,1)
		8,5	14,4 (±0,2)	12,8 (±0,0)	13,0 (±0,2)	39,3 (±0,1)	42,0 (±0,1)	42,1 (±0,1)
	65	6,9	14,1 (±0,3)	12,4 (±0,1)	12,4 (±0,1)	39,3 (±0,3)	41,5 (±0,1)	42,2 (±0,1)
		7,6	13,9 (±0,1)	12,5 (±0,2)	12,2 (±0,1)	39,3 (±0,1)	42,2 (±0,1)	42,2 (±0,1)
		8,5	14,1 (±0,1)	12,5 (±0,1)	12,4 (±0,2)	39,2 (±0,3)	42,3 (±0,2)	42,5 (±0,1)

Para este estudo inicial, ainda foi possível verificar a libertação de cromóforos, quer a nível visual pela diferença notória da cor dos filtrados residuais e do controlo (Figura 22), quer pela medição das absorvâncias no espetrofotómetro a 280 nm e a 457 nm, dando indicação da quantidade de lenhina libertada e cromóforos, respetivamente (Figura 23). As diferenças entre as duas cargas enzimáticas (70 e 100 g/tAD), não são muito notórias, tal como observado na Tabela 9, pelo que na Figura 23 apenas se encontram os valores para a carga enzimática de 100 g/tAD.

Figura 22 – Diferença de cor dos filtrados residuais obtidos após a aplicação de um estágio com enzima (escuro) e sem enzima (controlo-claro).

Por observação da Figura 22, verifica-se, que apenas com uma análise a olho nu, se consegue observar o efeito da enzima na remoção de agentes cromóforos.

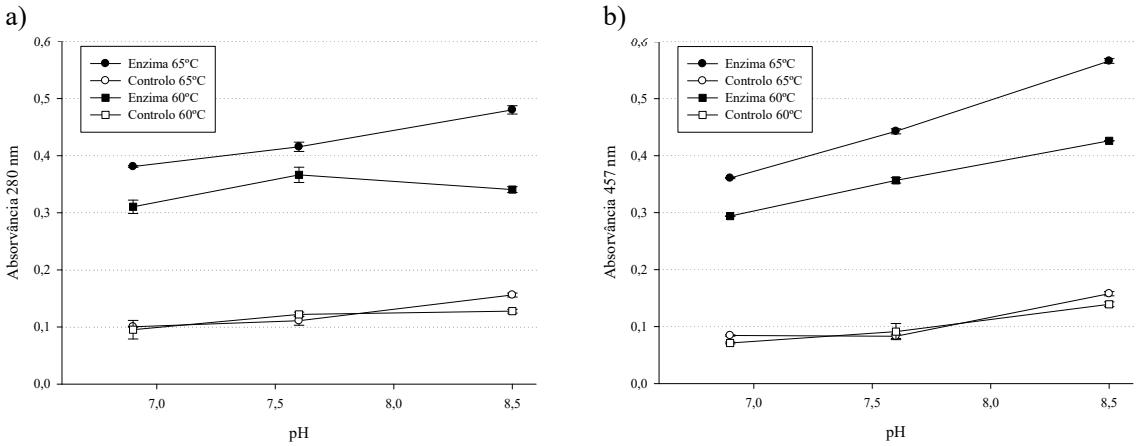


Figura 23 – Efeito da temperatura na remoção de lenhina (a) e de cromóforos (b), absorvância do filtrado a 280 e a 457 nm, respectivamente, usando uma carga enzimática de 100 g/tAD.

Pela Figura 23, verifica-se mais uma vez que a temperatura de 65ºC aparenta ser a mais adequada, visto que ocorreu uma maior remoção quer de lenhina como de cromóforos. Para qualquer estudo é importante comparar os valores obtidos com os dos ensaios de controlo (ensaio efectuado nas mesmas condições, mas sem a adição de enzima), uma vez que, o efeito do pH provoca pequenas alterações nos diferentes parâmetros analisados. Assim, verifica-se uma grande diferença nas absorvâncias dos filtrados obtidos após a aplicação da enzima, em comparação com o controlo, o que indica, mais uma vez, a ocorrência da libertação da lenhina e agentes cromóforos devido à hidrólise das xilanas pela xilanase.

É de salientar na Tabela 9 e na Figura 23, que os valores de pH indicados são os valores reais (o que acontecerá ao longo de toda a discussão de resultados), embora se tenham preparado soluções tampão com os pH referidos no Capítulo Materiais e Métodos (7, 8, 9 e 10). O abaixamento de pH ocorreu quando estas soluções foram misturadas com a pasta.

Perante os resultados apresentados, optou-se por focar os estudos que se seguem na temperatura de 65ºC, nomeadamente o estudo do efeito da variação da carga enzimática e do pH. Observando na Figura 24 a variação de IK relativamente à pasta crua, verifica-se que não ocorrem grandes diferenças quando se faz variar o pH entre 7 e 9. Contudo, quando se aplica uma solução tampão com pH 10, verifica-se uma menor variação de IK, o que indica que está a ocorrer uma menor remoção de lenhina e/ou ácidos hexenurónicos como consequência de uma menor actuação da enzima. Quanto à variação da carga enzimática, verifica-se que o valor de IK começa a estabilizar para cargas superiores a 50 g/tAD (e valores de pH entre 7 e 9), o

que poderá indicar que a carga de enzima aplicada já é excedente ou que haja algum impedimento físico de acesso, encontrando-se assim o valor de IK em zona de patamar.

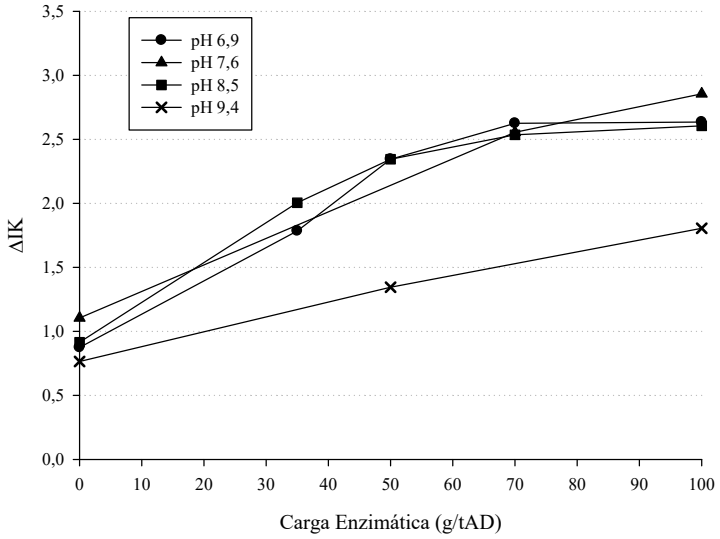


Figura 24 – Efeito do pH e carga enzimática na variação de IK, relativamente à pasta crua P1, para a temperatura de 65ºC.

Na Figura 25, encontra-se representado o valor da brancura ISO das diferentes pastas em função do pH para diferentes cargas enzimáticas. Verifica-se, mais uma vez, que para o pH mais elevado (9,4) a diferença entre a brancura da pasta tratada com enzima e a da pasta controlo é muito menor do que para os restantes pH, o que indica mais uma vez a perda de eficiência que a enzima tem para pH mais elevados. Para os restantes pH verificam-se efeitos semelhantes.

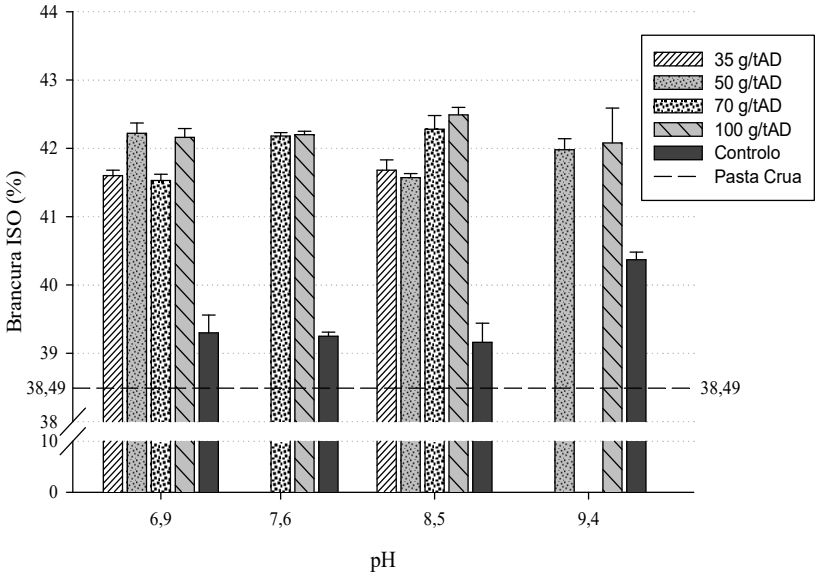


Figura 25 – Efeito do pH e carga enzimática na Brancura ISO (Pasta P1), para a temperatura de 65ºC.

Pretende-se que as condições de operação da enzima sejam as mais próximas possível da realidade fabril da torre de armazenamento. Contudo, o pH aplicado nestas é muito elevado (10,5-11,5), gama onde a enzima já não apresenta grande eficiência de atuação. Assim, optou-se por aplicar no estágio enzimático, em ensaios subsequentes, o pH de 8,5, uma vez que foi o pH mais elevado que aparentou ainda ser adequado para a aplicação da enzima. No que diz respeito à carga enzimática, e observando a Figura 25 em conjunto com a Figura 24, optou-se por uma carga de 50 g/tAD, de modo a evitar a zona de patamar. Assim, para a sequência XDE, o tratamento enzimático será efectuado nas condições de temperatura, pH, carga enzimática e tempo de 65ºC; 8,5; 50 g/tAD e 60 minutos, respetivamente.

Para além destes estudos, e tendo em consideração a possível aplicação do estágio X noutras unidades industriais, ainda se testou a eficiência da enzima para gamas de temperatura mais elevadas e compararam-se os resultados com os obtidos para a temperatura de 65ºC (para um pH de 8,5). Pela Figura 26, onde se apresenta os ganhos de brancura obtidos em relação à pasta crua, é possível verificar que ocorre um aumento do ganho de brancura para as temperaturas de 75 e 85ºC relativamente à temperatura mais baixa. Contudo, também ocorre um maior ganho de brancura para o respetivo ensaio de controlo. Assim, obtém-se um ganho de brancura (relativamente aos controlos) de 2,41; 2,39 e 2,04 unidades de brancura ISO, para as temperaturas de 65, 75 e 85ºC, respetivamente. Com estes valores, é possível concluir que a xilanase ainda atua de forma semelhante para a temperatura de 75ºC e perde um pouco de eficiência quando se aplica uma temperatura de 85ºC, em comparação com 65ºC. É de salientar que a temperatura escolhida para os estágios enzimáticos seguintes teve em conta a gama de temperaturas aplicadas na torre de armazenamento da unidade fabril alvo de estudo (60-65ºC).

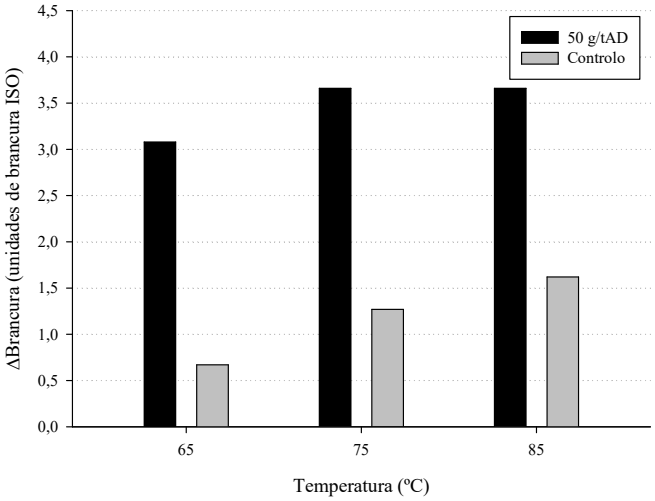


Figura 26 – Efeito da temperatura no ganho de brancura, relativamente à pasta crua P1, para pH de 8,5.

Estudou-se o efeito da variação das condições operatórias do tratamento enzimático, na remoção de ácidos hexenurónicos e de lenhina, tal como apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 – Efeito das diferentes condições operatórias na remoção de HexA e lenhina (Pasta P1).

Temperatura (ºC)	pH	Carga Enzimática (g/tAD)	IK	HexA (mmol/kg)	IK* corrigido	Remoção de HexA** (%)	Remoção de lenhina** (%)
65	6,9	0 (Controlo)	14,1 (±0,3)	53,5 (±1,7)	9,3	-	-
		35	13,2 (±0,0)	49,5 (±2,0)	8,8	7,5	5,9
		50	12,7 (±0,3)	45,3 (±1,2)	8,6	15,3	7,7
		70	12,4 (±0,1)	46,8 (±0,3)	8,2	12,5	12,2
		100	12,4 (±0,1)	44,4 (±2,7)	8,4	16,9	10,1
	7,6	0 (Controlo)	13,9 (±0,1)	56,3 (±1,3)	8,8	-	-
		70	12,5 (±0,2)	45,7 (±0,9)	8,3	18,8	5,7
		100	12,2 (±0,1)	44,7 (±2,7)	8,1	20,7	7,9
	8,5	0 (Controlo)	14,1 (±0,1)	52,4 (±1,4)	9,4	-	-
		35	13,0 (±0,0)	44,2 (±0,2)	9,0	15,6	3,7
		50	12,7 (±0,1)	46,0 (±0,1)	8,5	12,2	9,2
		70	12,5 (±0,1)	47,2 (±0,4)	8,2	9,9	12,3
		100	12,4 (±0,2)	45,7 (±1,4)	8,3	12,9	11,5
	9,4	0 (Controlo)	14,2 (±0,2)	55,4 (±0,0)	9,3	-	-
		50	13,7 (±0,1)	46,0 (±0,0)	9,5	17,0	-
		100	13,2 (±0,2)	45,1 (±0,4)	9,1	18,6	1,3
75	8,5	0 (Controlo)	14,4 (±0,2)	55,8 (±2,0)	9,4	-	-
		50	13,4 (±0,2)	45,9 (±1,0)	9,3	17,8	1,3
85	8,5	0 (Controlo)	14,3 (±0,0)	54,3 (±0,1)	9,4	-	-
		50	13,3 (±0,2)	44,4 (±1,3)	9,3	18,3	1,2

* $IK_{corrigido}=IK-0{,}09C_{HexA}$; ** - relativamente ao ensaio de controlo.

Por observação da Tabela 10, verifica-se que, para a carga de 50 g/tAD e pH 8,5, as maiores percentagens de remoção de HexA correspondem às temperaturas mais elevadas (75 e 85º). No entanto, a remoção de lenhina é das mais baixas. O efeito do aumento do pH, para a temperatura de 65ºC, não é consistente na remoção de HexA embora seja significativo (situando-se entre 12-17%, na carga 50 g/tAD; 12 a 21%, na carga de 100 g/tAD). A remoção de lenhina é desprezável para pH 9,4, enquanto para pH mais baixo, a variação na remoção de lenhina não revela uma tendência clara com o aumento do pH (situando-se entre 7 e 12%, para cargas entre 50 e 100 g/tAD).

Quer para os estudos efetuados a pH 9,4 e temperatura 65ºC quer para pH 8,5 e temperaturas mais elevadas (75 e 85ºC) a actuação da xilanase é centralizada na hidrólise das ligações entre monómeros que contêm grupos hexenurónicos em detrimento das porções de xilana com ligações à lenhina.

No que diz respeito à carga enzimática, o seu aumento favorece a remoção de lenhina (4 a 12 % para cargas de 35 a 100 g/tAD) e tende a beneficiar a remoção de HexA (8 a 17 %),

embora a evolução não seja consistente em todos os ensaios. Globalmente os efeitos na remoção de HexA são maiores quando a carga aumenta de 35 para 50 g/tAD, mas na remoção de lenhina os efeitos ainda se prolongam quando a carga sobe até 70 g/tAD.

Salienta-se que os valores de HexA para as pastas controlo são, na sua maioria, superiores ao da pasta crua (52,5 mmol/kg), mas estão dentro do erro associado ao teste da quantificação de HexA que é na ordem de 4,8 mmol/kg (Pedroso & Carvalho, 2003).

A Tabela 11 apresenta a caracterização das pastas, antes e após o estágio enzimático, aplicado nas condições seleccionadas como mais adequadas (65ºC, pH 8,5, 60 min e 50 g/tAD).

Tabela 11 – Caracterização da pasta com estágio enzimático para pH 8,5, carga enzimática de 50 g/tAD e 65ºC e respetiva pasta controlo (P1).

Pasta	IK	Viscosidade (mL/ g)	HexA (mmol/kg)	Brancura ISO (%)
Enzima	12,7 (±0,3)	1252 (±6)	46,0 (±0,1)	41,6 (±0,1)
Controlo	14,1 (±0,1)	1249 (±14)	52,4 (±1,4)	39,2 (±0,3)

Observando a Tabela 11, verifica-se que a aplicação do estágio enzimático, relativamente ao controlo, permite, uma diminuição de 1,4 e 6,4 de unidades de IK e HexA, respetivamente, e um aumento de 2,4 unidades de brancura.

6.4. Curvas de Branqueamento (DEp)

Para a realização da sequência final XDE_P, foi necessário, em primeiro lugar, traçar curvas de branqueamento da pasta P1 (com cargas crescentes de dióxido de cloro) de modo a que as cargas aplicadas de reagentes não fossem demasiado elevadas (com efeito pouco significativo no aumento de brancura), de tal modo que o desempenho do estágio enzimático prévio não fosse detetado. Várias foram as cargas testadas, tal como ilustrado na Figura 27, onde se encontra representada a evolução da brancura para diferentes cargas de dióxido de cloro, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio. De notar que, mais uma vez, estes testes foram apenas efetuados na pasta P1 lavada.

A Figura 27, evidencia que para maior carga de ClO_2 aplicada, maior será a brancura da pasta, uma vez que este reagente químico atua na redução ou eliminação da lenhina residual e cromóforos presentes na pasta (Bajpai, 2012). No entanto, principalmente na curva de 1,3% NaOH e 0,30% de H_2O_2, verifica-se que a brancura da pasta tende para um valor máximo (em patamar), justificando assim o facto de, geralmente, se aplicar vários estágios numa sequência

de branqueamento, de modo a ser promovida a remoção de lenhina, ao invés de aumentar desmesuradamente a carga de reagente (Suess, 2010). Para além da variação de ClO_2, é de salientar que a variação da carga de NaOH e H_2O_2 também tem grande influência na branqueabilidade da pasta, visto que estes químicos atuam de forma a solubilizar e oxidar a lenhina, respectivamente (Dence & Reeve, 1996). Contudo, não se verifica grande efeito quando apenas se faz aumentar a carga de NaOH, fixando a carga de H_2O_2, o que pode indicar que a variação deste último poderá ter maior influência na evolução da brancura das pastas que o NaOH.

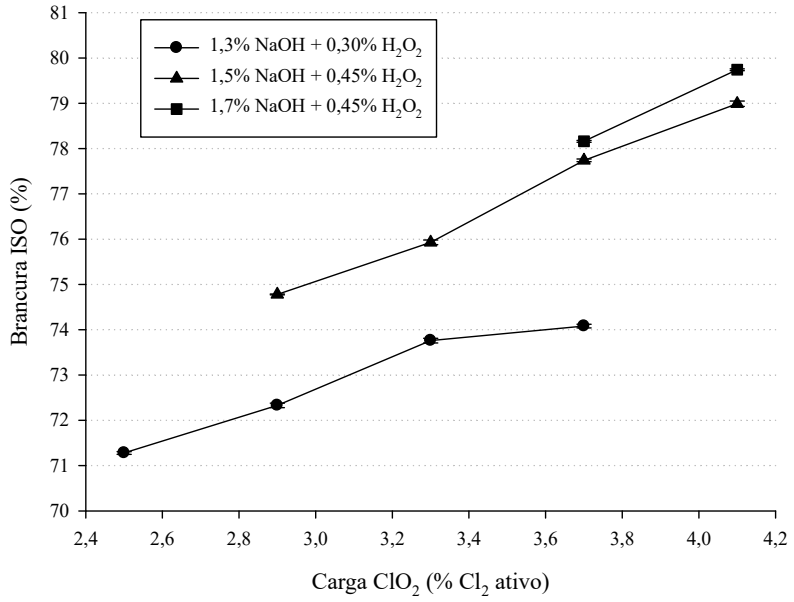


Figura 27 – Evolução da brancura em função da carga de ClO_2 aplicada na pasta P1.

Para além da evolução da brancura, foi também avaliada a evolução do IK e da viscosidade intrínseca da pasta, para um maior entendimento da remoção da lenhina residual e da degradação dos polissacarídeos, respetivamente. Em duas pastas foi ainda avaliada a remoção de ácidos hexenurónicos com o aumento da carga de dióxido de cloro. Os valores obtidos encontram-se apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores obtidos para IK, Viscosidade, HexA e IK corrigido nas diferentes curvas de branqueamento estudadas.

Carga de ClO_2 (% Cl_2 ativo)	IK			Viscosidade (mL/g)			HexA (mmol/kg)	IK corrigido
	Curva 1*	Curva 2**	Curva 3***	Curva 1*	Curva 2**	Curva 3***	Curva 2**	Curva 2**
2,5	5,6 (±0,1)	-	-	1085 (±5)	-	-	-	-
2,9	5,3 (±0,0)	4,8 (±0,1)	-	1098 (±13)	1079 (±17)	-	-	-
3,3	4,9 (±0,0)	4,2 (±0,1)	-	1111 (±3)	1068 (±5)	-	17,2 (±0,1)	2,6
3,7	4,8 (±0,1)	3,8 (±0,2)	3,9 (±0,0)	1103 (±7)	1089 (±9)	1068 (±7)	15,8 (±0,8)	2,3
4,1	-	3,1 (±0,1)	3,3 (±0,1)	-	1085 (±16)	1064 (±14)	-	-

* 1,30% NaOH + 0,30% H_2O_2; ** 1,50% NaOH + 0,45% H_2O_2; *** 1,70% NaOH + 0,45% H_2O_2

Na Tabela 12, observa-se uma diminuição do IK à medida que se aumenta a carga de ClO_2, o que era expectável, uma vez que quanto maior a carga deste reagente, maior a remoção da lenhina residual na pasta (bem como de HexA), aumentando assim a brancura, como verificado na Figura 27. A evolução do IK para as condições de 1,3% NaOH e 0,3% de H_2O_2 tende para um patamar, o que está concordante com a brancura atingida para estas mesmas condições. Por outro lado, para as restantes condições apresentadas (curvas 2 e 3), esta tendência não é visível quando se aumenta a carga de NaOH de 1,50% para 1,70% (mantendo fixa a carga de H_2O_2 em 0,45%), não apresentando diferenças significativas nos valores de IK entre a curva 2 e 3.

Relativamente à viscosidade, observa-se na Tabela 12 que houve uma diminuição neste parâmetro de 133 a 180 pontos, em relação à pasta crua (1244 mL/g). Embora o dióxido de cloro seja muito seletivo, isto é, reaja preferencialmente com a lenhina não provocando grande degradação da celulose ou hemiceluloses (Sixta, 2006), a utilização de um estágio de extração alcalina com peróxido de hidrogénio pode causar perda de resistência da pasta (Dence & Reeve, 1996; Gangwar *et al.*, 2014). Os valores da viscosidade apresentados, são todos semelhantes, uma vez que não existe uma diferença maior a 50 pontos (erro associado ao teste da viscosidade). No entanto, é notório que o aumento da carga alcalina de 1,3 para 1,7 %NaOH provoca uma diminuição consistente na viscosidade.

Fazendo uma análise breve à remoção de lenhina e de ácidos hexenurónicos, verifica-se que para a curva 2, quando se aumenta a carga de ClO_2 de 3,3 para 3,7%, ocorre uma diminuição da concentração de ácidos hexenurónicos e também uma diminuição do IK corrigido. Assim,

ocorre uma remoção de HexA de 67,1 e 69,9% e uma remoção de lenhina de 74,8 e 77,7% para as cargas de 3,3% e 3,7%, respetivamente, em relação à pasta crua (52,3 mmol/kg de HexA e 10,3 de IK corrigido). Um aumento de 0,4% na carga de dióxido de cloro, traduz-se numa diminuição de 2,8 e 2,9% de HexA e lenhina, respetivamente. Estes valores evidenciam a atuação do dióxido de cloro na remoção de agentes cromóforos, nomeadamente, lenhina residual e ácidos hexenurónicos (Bajpai, 2012).

Para as curvas de branqueamento, foi ainda avaliada a estabilidade da brancura, recorrendo ao valor de PC number - Figura 28. Para a curva com menor e carga de NaOH aplicada, não existe grande alteração na estabilidade de brancura quando se aumenta a carga de ClO_2. No entanto, para a carga de 1,50% NaOH + 0,45%H_2O_2, observa-se que quanto maior a carga de dióxido de cloro, menor é o PC number, ou seja, maior é a estabilidade de brancura. A maior carga de ClO_2 conjugada com uma maior carga de NaOH e de H_2O_2 na extração, levou a uma maior remoção de compostos potencialmente cromóforos que seriam produzidos durante o envelhecimento da pasta. Por último, comparando as curvas correspondentes a cargas de NaOH de 1,50% e 1,70%, o valor de PC number é maior para a última, o que poderá ser causado pelo facto do hidróxido de sódio causar escurecimento da pasta (Dence & Reeve, 1996).

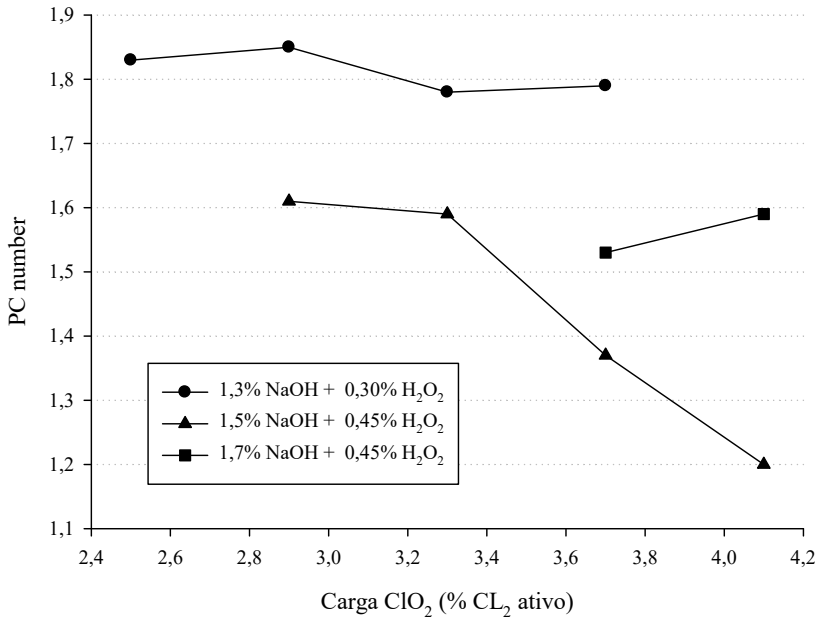


Figura 28 – PC number em função da carga de ClO_2 para as curvas de branqueamento (Pasta P1).

Por fim, e observando todos os valores obtidos para as curvas de branqueamento, optou-se por aplicar aos ensaios de controlo cDEP, as cargas de 3,3; 3,7 e 4,1% de ClO_2, 1,5% NaOH

e 0,45% H_2O_2, para uma possível comparação, principalmente em termos de ganhos de brancura e de poupança de reagentes com a sequência XDE_P. Esta decisão teve em conta a realidade fabril, uma vez que, com estas condições, se conseguiram obter valores de IK próximos desta. Para além disso, os valores obtidos para as curvas de 1,5 e 1,7% de NaOH não apresentaram grande diferença, não havendo benefícios em usar uma carga tão grande deste reagente. Para a sequência XDE_P, optou-se por aplicar uma carga de 3,3%, 1,5% e 0,45% de ClO_2, NaOH e H_2O_2, respetivamente.

6.5. Sequência XDEp e cDEp (Controlo)

Como resultado dos estudos apresentados nas secções anteriores, aplicou-se na sequência XDE_P e cDE_P as condições que aparentaram ser as mais adequadas. Assim, aplicou-se uma carga de 50g/tAD na pasta P1 e P2 e, adicionalmente, aplicou-se também uma carga de 100g/tAD de xilanase na pasta P2 (lavada e não lavada), uma vez que como a pasta continha uma grande carga orgânica, a carga mais baixa poderia não ser suficiente para que a enzima atuasse de forma adequada. O estágio enzimático foi feito a pH 8,5 e a uma temperatura de 65ºC. A carga de dióxido de cloro aplicada foi de 3,3% nas pastas com enzima e 3,3; 3,7 e 4,1% Cl_2 ativo nas pastas controlo. Por último, no estágio de extração alcalina foi aplicada uma carga de 1,5% e 0,45% de NaOH e H_2O_2.

6.5.1. Pasta P1

Na pasta P1 começou por estudar-se o efeito do tratamento enzimático no ganho de brancura ISO e no PC number da pasta XDE_P, relativamente ao controlo, cDE_P – Tabela 13. Apresenta-se ainda na Tabela 13 os valores para a pasta crua e DE_P, de modo a observar a evolução dos diferentes parâmetros analisados.

Em comparação com o controlo, o tratamento enzimático permite um aumento de 2,8 unidades de brancura ISO na pasta, valor superior à diferença de 2,4 unidades obervada na Figura 25 (secção 6.3), no ganho de brancura do estágio X (50 g/tAD, pH 8,5 e 65ºC) em relação ao controlo. Estes valores mostram assim um efeito positivo da aplicação da xilanase, facilitando a impregnação dos reagentes nos estágios subsequentes seguintes e aumentando a brancura da pasta. Também é possível constatar que no ensaio de controlo, o efeito do pH e temperatura, permitem um aumento de 1,6 unidades de brancura, relativamente à sequência

DE_P. O aumento da brancura na sequência XDE_P, pode ser justificada pelo facto da xilanase alterar a estrutura da fibra, permitindo um maior contacto entre os agentes de branqueamento nos estágios seguintes (Gangwar *et al.*, 2014).

Tabela 13 – Brancura ISO e PC number nas sequências XDE (50g /tAD), cDE e DE para uma carga de 3,3% de ClO_2 (como Cl_2 ativo) na pasta P1.

Pasta (P1)	Brancura ISO (%)	PC number
Crua	38,5 (±0,0)	-
DE_P	75,9 (±0,1)	1,59
cDE_P	77,5±0,5	1,41±0,11
XDE_P	80,3±1,0	1,23±0,02

No que diz respeito à estabilidade de brancura, representada na Tabela 13 pela evolução do PC number, verifica-se que esta é maior na pasta com a sequência XDE_P, comparativamente à sequência DE_P e cDE_P, uma vez que o valor de PC number é menor. Isto pode dever-se ao facto dos ácidos carboxílicos que possam provocar reversão da brancura na pasta, terem sido removidos no tratamento com a xilanase (Thakur *et al.*, 2012). Comparando a sequência DE_P e cDE_P verifica-se que a reversão de brancura foi maior na primeira, indicando mais uma vez o efeito do pH e temperatura na remoção de material cromogéneo.

Para complementar estes resultados, encontra-se na Tabela 14, os valores obtidos para IK, viscosidade e HexA.

Tabela 14 – IK, Viscosidade e HexA nas sequências XDE (50g /tAD), cDE e DE para uma carga de 3,3% de ClO_2 (como Cl_2 ativo) na pasta P1.

Pasta (P1)	IK	Viscosidade (mL/g)	HexA (mmol/kg)	IK corrigido
Crua	15,0 (±0,2)	1244 (±11)	52,5 (±0,5)	10,3
DE_P	4,2 (±0,1)	1068 (±5)	17,2 (±0,1)	2,6
cDE_P	3,9±0,3	1081±19	17,9±3,3	2,3±0,0
XDE_P	3,3±0,4	1097±13	16,6±1,1	1,8±0,3

Por observação da Tabela 14, verifica-se que ocorre uma diminuição de IK e HexA na sequência XDE_P em relação ao controlo. Estes valores traduzem-se numa remoção de lenhina residual e HexA em cerca de 20,8% e 7,2%, relativamente ao controlo. A remoção destes compostos pode justificar o aumento da brancura na pasta com enzima em relação ao controlo, uma vez que são compostos cromóforos (Loureiro, 2012; Sixta, 2006). Esta remoção, traduz

ainda a atuação da xilanase na pasta, uma vez que a enzima promove a hidrólise parcial das xilanas, facilitando a remoção de fragmentos contendo ligações lenhina-xilana (LCC), ou grupos hexenurónicos (Walia *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2015).

A viscosidade apresentada pela pasta após uma sequência XDE_P é ligeiramente maior do que a do respetivo controlo, o que é justificado pela remoção parcial de hemiceluloses, com menor grau de polimerização do que a celulose, aumentando assim, em média, o grau de polimerização da pasta e, portanto, maior valor de viscosidade. No entanto, seria útil uma análise mais aprofundada da degradação dos polissacarídeos, de modo a entender melhor a atuação da xilanase. Aparentemente esta solução enzimática não apresenta atividade celulolítica, uma vez que não ocorreu diminuição do valor da viscosidade (Sharma, M. & Kumar, A., 2013). No entanto, o efeito da remoção das xilanas poderá sobrepor-se, provocando então o aumento da viscosidade.

Para os valores de IK, viscosidade e HexA, ao contrário do que acontece à brancura e PC number, as diferenças entre as sequências DE_P e cDE_P não são tão notórias entre si, mas, no que diz respeito ao valor de IK corrigido, este é menor para cDE_P, o que indica uma maior remoção de lenhina residual, justificando assim a diferença de brancura estre estas duas pastas.

6.5.2. Pasta P2

Os estudos efetuados na pasta P2, serviram, essencialmente, para verificar o efeito do *carryover* presente na pasta fabril. Assim, e de modo semelhante ao efetuado na pasta P1, aplicaram-se as sequências XDE_P para ambas as pastas P2 (não lavada e lavada).

Na Figura 29, apresenta-se a evolução de brancura das pastas não lavada e lavada e respetivos ensaios de controlo (que correspondem à carga enzimática de 0 g/tAD). Independentemente da aplicação da enzima, a brancura após a sequência DE_P é maior na pasta previamente lavada do que na pasta não lavada rececionada. A diferença da brancura é mais significativa nos ensaios de controlo. Estas diferenças podem dever-se ao facto da pasta ter sofrido uma lavagem intensiva, removendo impurezas presentes na pasta e até alguns compostos coloridos. De notar que, no caso dos ensaios com pasta tal qual, tanto nos estágios enzimáticos como nos respetivos ensaios de controlo foi usado filtrado de lavagem proveniente da fábrica, tendo ele também uma elevada carga orgânica. Para uma mais fácil visualização,

encontra-se na Figura 30, uma imagem dos filtrados residuais obtidos após um estágio enzimático e de controlo das pastas lavada e não lavada XDE$_P$ ou cDE$_P$.

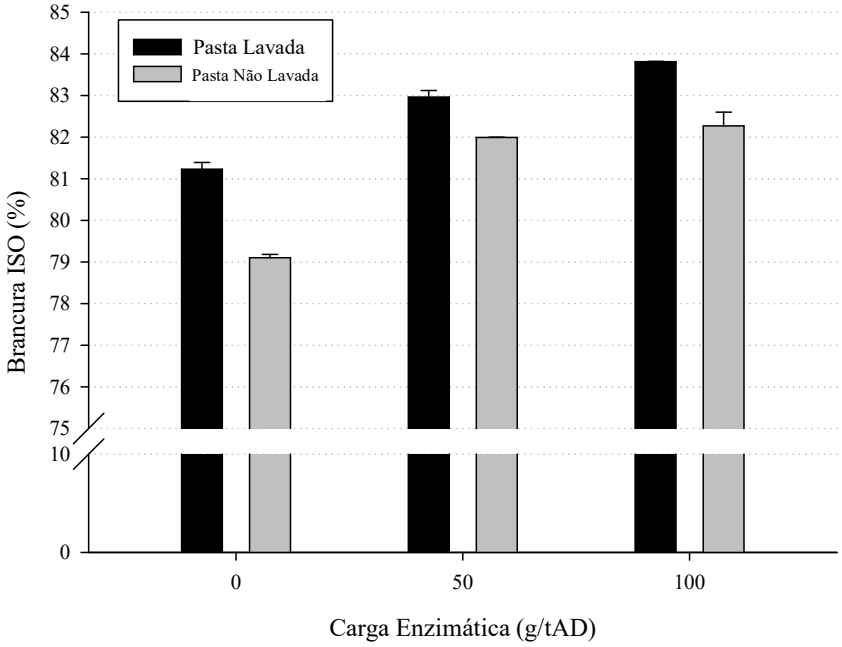


Figura 29 – Evolução da brancura ISO na pasta P2 lavada e não lavada em função da carga enzimática, para uma carga de ClO_2 de 3,3% (Cl_2 ativo), após uma sequência XDE.

Na Figura 30, observa-se a diferença nítida entre os filtrados residuais obtidos após um estágio enzámico e de controlo na pasta lavada e não lavada. Esta grande diferença de cor deve-se ao facto de na pasta lavada ser usada uma solução tampão preparada a nível laboratorial e na pasta não lavada ser usado um filtrado de lavagem proveniente da fábrica. A nível visual a diferença entre o estágio enzimático e o controlo, na pasta lavada, é bastante nítido, ao contrário do que se observa para a pasta não lavada.

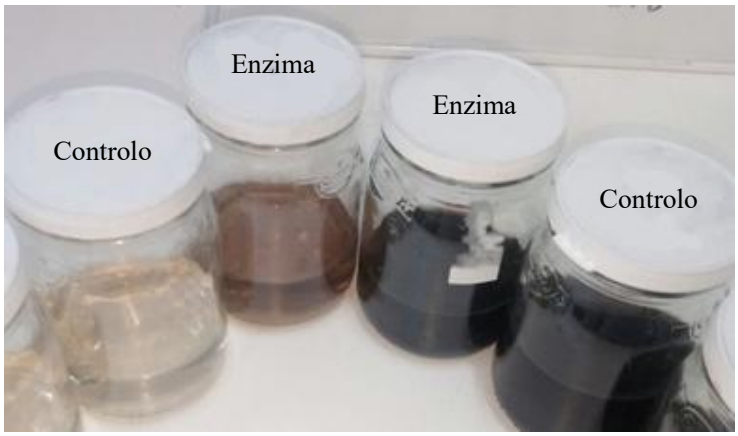


Figura 30 – Filtrados residuais obtidos para as pastas lavadas (residuais claros) e não lavada (residuais escuros) – Pasta P2.

Na Tabela 15 encontra-se apresentado os ganhos de brancura relativamente ao controlo para ambas as cargas (50 e 100 g/tAD) e pastas (lavada e não lavada), de modo a ter um maior entendimento da atuação da enzima. Como se pode verificar, o ganho de brancura é superior no caso da pasta não lavada, embora a brancura atingida seja inferior (Figura 30). A atuação da enzima aparenta ser mais eficaz na pasta não lavada. Esta verificação torna-se interessante a nível industrial, uma vez que permite o uso de enzimas com o filtrado de lavagem fabril (apenas com alteração do pH), reduzindo assim os custos operacionais relacionados com a implementação desta tecnologia.

Tabela 15 – Ganhos de brancura relativamente ao controlo para as pastas lavadas e não lavada, após uma sequência XDE_P, usando 3,3% em Cl_2 ativo como carga de ClO_2.

Pasta (P2)	**Ganho de Brancura em relação ao controlo (unidades de brancura ISO)**	
	50 g/tAD	100 g/tAD
Lavada	1,7	2,6
Não lavada	2,9	3,2

Com o aumento da carga enzimática, em ambas as pastas, verifica-se que quanto maior a carga, maior é o ganho de brancura. No entanto, esta diferença é menor na pasta não lavada, onde o aumento para o dobro da carga enzimática apenas permitiu um ganho de 0,3 unidades de brancura. Esta diferença pouco significativa permite constatar que na pasta não lavada basta uma carga de 50g/tAD para já ter efeitos bastantes significativos na brancura após uma sequência XDE_P.

Com a aplicação de um estágio enzimático, várias são as alterações ocorridas em diferentes parâmetros, tais como IK, HexA e viscosidade intrínseca. A evolução destes parâmetros encontra-se na Tabela 16, onde se apresentam os valores para a pasta crua lavada e sequências XDE_P e cDE_P, para ambas as cargas enzimáticas e pastas (lavada e não lavada).

Tabela 16 – IK, Viscosidade e HexA nas sequências XDE_P e cDE_P, para uma carga de 3,3% de ClO_2 (como Cl_2 ativo) na pasta P2 lavada e não lavada.

Pasta	Sequência	IK	Viscosidade (mL/g)	HexA (mmol/kg)	IK corrigido
Crua lavada	-	13,3 (±0,2)	1163 (±1)	48,6 (±0,6)	8,9
Lavada	XDE_P (50 g/tAD)	2,1±0,1	1031±36	9,4±0,3	1,3±0,1
	XDE_P (100 g/tAD)	2,2±0,2	1060±43	10,5±2,7	1,3±0,0
	cDE_P	2,9±0,2	1026±26	15,2±1,2	1,5±0,1
Não lavada	XDE_P (50 g/tAD)	2,5±0,1	1024±48	12,2±0,7	1,4±0,0
	XDE_P (100 g/tAD)	2,4±0,1	1032±11	12,7±2,1	1,2±0,1
	cDE_P	3,1±0,2	1018±14	15,9±1,1	1,7±0,3

Por observação da Tabela 16, verifica-se que os valores de HexA obtidos para a pasta não lavada são superiores, enquanto os de IK corrigido são semelhantes. Estes resultados corroboram os valores inferiores apresentados para a brancura da pasta não lavada em comparação com a pasta lavada (Figura 30).

A variação pouco significativa do valor da viscosidade indica que não houve degradação da celulose em qualquer uma das situações. Em comparação com a pasta crua lavada, verifica-se uma diminuição até 137 e 145 pontos de viscosidade, na pasta lavada e não lavada, respetivamente.

Na pasta lavada verifica-se uma remoção de lenhina residual em cerca de 12 e 15% na pasta lavada em relação ao controlo, para as cargas enzimáticas de 50 e 100 g/tAD. Estes valores são inferiores aos da pasta não lavada (19 e 27%), indicando assim que a remoção de lenhina residual relativamente ao controlo é maior nesta última. Por outro lado, a remoção de ácidos hexenurónicos é superior na pasta lavada, sendo de 38 e 31% relativamente ao controlo para a pasta lavada e de 23 e 20% na pasta não lavada, para as cargas enzimáticas de 50 e 100 g/tAD. Assim, verifica-se que a remoção de HexA é mais efetiva na pasta lavada. A presença de compostos polifenólicos (na lenhina dissolvida) provenientes da etapa de cozimento na pasta não lavada (que contrinui para o *carryover*) impede uma ação mais eficaz da enzima neste tipo de pasta.

Por último, para ambas as pastas, foi efetuado o teste de reversão de brancura, de modo a avaliar a estabilidade das mesmas no seu processo de envelhecimento. Na Figura 31, apresenta-se a evolução do PC number em função da carga enzimática, onde a carga de 0 corresponde aos ensaios de controlo.

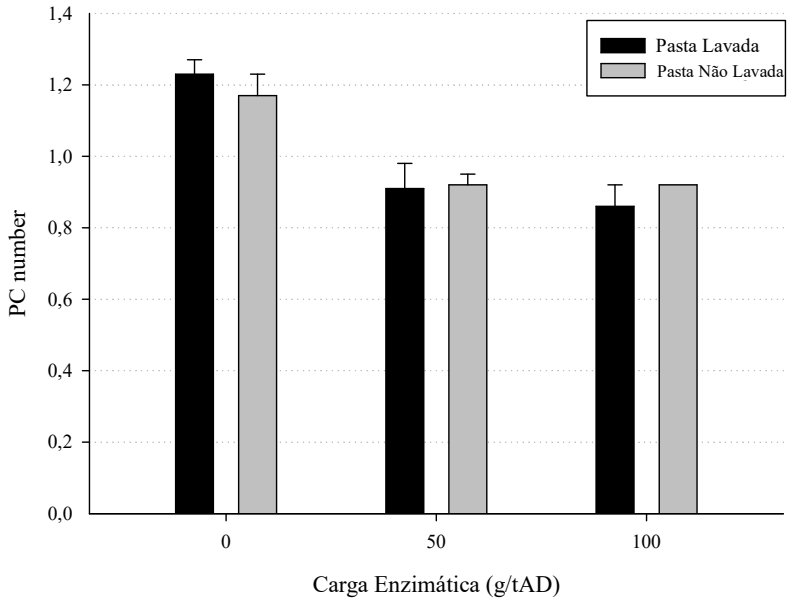


Figura 31 – Evolução do Pc number em função da carga enzimática para as pastas lavada e não lavada após uma sequência XDE com a carga de 3,3% de ClO_2 (Cl_2 ativo) na pasta P2.

Como se pode observar, o PC number para ambas as cargas enzimáticas nas duas pastas é inferior ao dos ensaios de controlo, o que significa que a brancura da pasta que teve a aplicação do estágio enzimático é mais estável no tempo. Para a carga de 50g/tAD verifica-se que a diferença entre a pasta lavada e não lavada é menos evidente. Com o aumento da carga enzimática, observa-se uma ligeira diminuição do PC number para a pasta lavada. Pelo contrário, na pasta não lavada, os valores de PC number aparentam ser iguais, com o aumento da carga enzimática, tal como tinha sucedido com os valores de IK, HexA, Viscosidade e Brancura que também são semelhantes para ambas as cargas enzimáticas.

Avaliando o efeito do *carryover*, observa-se que este não impede totalmente a atuação da enzima porque o ganho de brancura é maior para a pasta não lavada, relativamente ao controlo, embora a brancura seja superior, em valor absoluto, para a pasta lavada. Para a pasta não lavada observa-se uma menor remoção de HexA em relação ao controlo e uma remoção de lenhina ligeiramente superior. A extensão da degradação dos polissacarídeos e a estabilidade de brancura no tempo são semelhantes para as duas pastas.

Concluindo, este processo biotecnológico pode ser empregue numa unidade industrial sem grandes investimentos e alterações dos processos existentes, uma vez que a única alteração proposta é a modificação do pH da torre de armazenamento para cerca de 8,5.

6.6. Rendimento

Com a aplicação da xilanase numa sequência de branqueamento, ocorre corte da cadeia da xilana, promovendo a dissolução da fração menor. Consequentemente, com a remoção de hemiceluloses, ocorre a perda de rendimento da pasta, sendo esta uma desvantagem da utilização do tratamento enzimático (Bajpai & Bajpai, 1997).

Ao longo deste trabalho, e após cada ensaio, foi efetuada a separação da componente líquida (filtrado residual) por filtração da pasta num filtro de placa porosa, de modo a minimizar a perda de fibras durante a filtração e lavagem e determinar a perda de rendimento que a enzima provocava. Assim, foi determinado o rendimento após o estágio X e no final da sequência XDE_P e cDE_P (sabendo que se partia sempre de 20 g de fibra em base seca). Na Tabela 17, encontram-se apresentados os valores obtidos, bem como a perda de rendimento relativamente ao controlo (e apenas para a carga enzimática de 50 g/tAD).

Tabela 17 – Rendimento e perda de rendimento em relação ao controlo após as sequências X e XDE_P para as pastas P1 e P2, com uma carga enzimática e de ClO_2 de 50 g/tAD e 3,3% (Cl_2 ativo), respetivamente.

Pasta		Rendimento (%)		Perda em relação ao controlo (unidades de rendimento)
		Enzima	Controlo	
P1	X	98,4 (±0,6)	100 (±0,3)	1,6
	XDE_P	96,5±0,8	97,8±0,1	1,3
P2 lavada	X	96,4 (±0,1)	98,0 (±0,8)	1,6
	XDE_P	95,5±0,8	98,2±0,6	2,7
P2 não lavada	X	99,1 (±0,6)	100 (±0,3)	0,9
	XDE_P	96,4±1,0	99,1±0,3	2,6

Por observação da Tabela 17, verifica-se a menor perda de rendimento em relação ao controlo é obtida após o estágio X aplicado na pasta P2 não lavada, o que poderá indiciar que tem mais vantagem utilizar a enzima na pasta com carga orgânica na fase líquida associada. Por outro lado, após a sequência XDE_P, obtém-se uma perda superior para as pastas P2, independentemente da existência de carga orgânica na fase líquida. Além disso, as pastas controlo P2 têm rendimento superior à da Pasta P1. A diferença nas condições fabris de obtenção das duas pastas (P1 e P2) poderá ser uma das causas para uma resposta diferente à sequência DE_P. De facto, outros estudos apontam que, com o aumento da carga enzimática, ocorre uma diminuição bastante significativa do rendimento (Cheng *et al.*, 2013). Assim, a

carga utilizada no presente trabalho, de 50 g/tAD, pode ter sido elevada, mas não foi possível efectuar este estudo no tempo útil disponível. Gübitz *et al.* (1997) reportou perdas de rendimento de cerca de 16% devido à presença de celulases no complexo enzimático. Não só pela perda de rendimento não apresentar valores tão elevados, mas também por não haver diminuição de viscosidade, pode assumir-se que o complexo enzimático usado no presente trabalho não continha celulases. A verificação através da determinação de atividade celulolítica, nomeadamente com o substrato "papel de filtro", não foi efectuada.

Outros estudos apontam para uma perda apenas de 0,50% no rendimento, relativamente ao controlo, em pastas *kraft* de eucalipto, quando se aplica o estágio enzimático numa pasta não branqueada, com um ganho de brancura de 1,2 pontos de brancura (Thakur *et al.*, 2012).

6.7. Poupança de Reagentes

Uma das grandes vantagens da utilização da xilanase no branqueamento, é a poupança de reagentes de branqueamento associada. Assim, fez-se uma avaliação desta poupança, principalmente para o dióxido de cloro. No final efetuou-se na pasta P2, um estudo adicional, onde se testou a poupança dos três reagentes de branqueamento utilizados (ClO_2, H_2O_2 e NaOH), e comparou-se a brancura atingida.

6.7.1. Pasta P1

Para a pasta P1, foi estimada a poupança de ClO_2 recorrendo a utilização de três pastas de controlo com as cargas de 3,3; 3,7 e 4,1% deste reagente. Na Figura 32, apresenta-se o valor de target atingido com a utilização do estágio enzimático (XDE_P – carga enzimática de 50 g/tAD) e para uma carga de 3,3% de dióxido de cloro, representado pela reta horizontal. Para além disso, encontra-se a curva de branqueamento correspondente às pastas de controlo (cDE_P), onde se utilizam as mesmas condições que no estágio enzimático, mas sem adição de enzima.

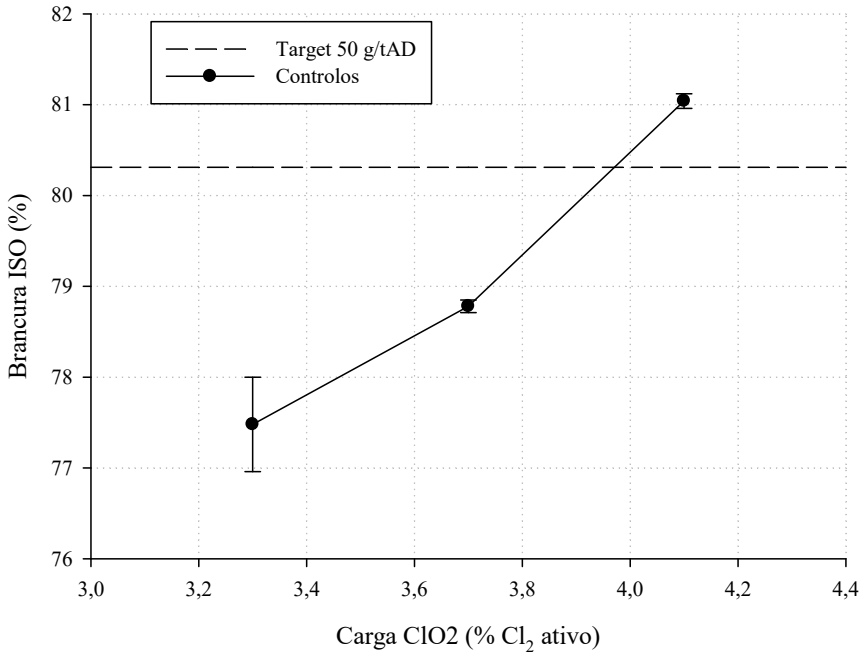


Figura 32 – Poupança de dióxido de cloro na pasta P1 com a aplicação da xilanase a 50 g/tAD, pH 8,5 e 65ºC. Target com uma carga de 3,3% (Cl_2 ativo) de dióxido de cloro.

Através da análise detalhada do gráfico, verifica-se que a curva das pastas de controlo intersecta o target para a carga de dióxido de cloro de 3,97% em Cl_2 ativo. Esta interseção significa que para a carga de 3,97% de ClO_2 se obtém a mesma brancura que a pasta com a sequência XDE_P, porém sem aplicação do estágio enzimático.

A poupança de ClO_2 foi calculada através da Equação 21, sendo esta de 17%.

$$\text{Poupança } ClO_2(\%)=\frac{3{,}97-3{,}3}{3{,}97}\times 100=17\% \qquad (21)$$

6.7.2. Pasta P2

Para a pasta P2, procedeu-se de igual modo à Pasta P1. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 33 para a pasta lavada e pasta não lavada.

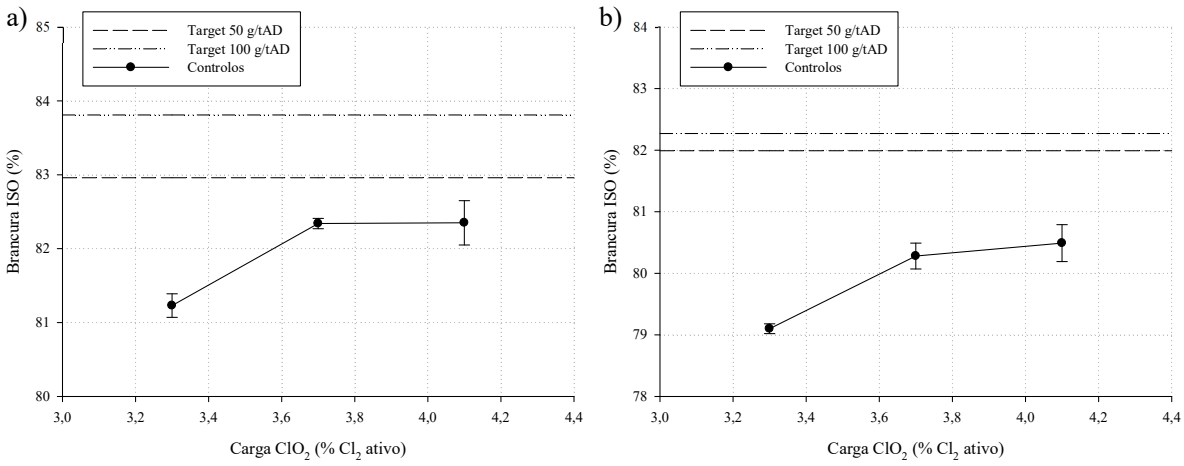


Figura 33 - Brancura da pasta P2 com diferentes cargas de dióxido de cloro (controlo) e com a aplicação da xilanase a 50 e 100 g/tAD, pH 8,5 e 65ºC (target com uma carga de 3,3% de dióxido de cloro, como Cl_2 ativo): a) pasta lavada; b) pasta não lavada.

Por observação da Figura 33, verifica-se que as curvas da brancura das pastas de controlo tendem para um patamar, não atingindo a brancura obtida com a aplicação do estágio enzimático. Assim, não é possível estimar a poupança de dióxido de cloro, ao contrário do que foi feito para a pasta P1 (a pasta P1 crua apresentava um IK superior ao da Pasta P2 crua). Esta estabilização atingida pelas pastas de controlo evidencia uma menor reatividade da lenhina residual da pasta P2 ao ClO_2. No entanto, a xilanase consegue remover compostos cromóforos residuais, atingindo uma brancura mais elevada que as pastas controlo.

Adicionalmente, foi efetuado um teste de poupança dos três reagentes de branqueamento. Para tal, aplicou-se na pasta P2 (lavada e não lavada) uma sequência XDE_P nas seguintes condições operatórias: X - 50 g/tAD, pH 8,5, 65ºC; D - 3,7% como Cl_2 ativo; E_P - 1,35% de NaOH e 0,36% de H_2O_2. Os resultados foram comparados com os da sequência cDE_P nas seguintes condições operatórias: c - pH9, 65ºC; D - 4,1% como Cl_2 ativo; E_P - 1,5% NaOH e 0,45% H_2O_2. Os valores de brancura ISO obtidos encontram-se apresentados na Figura 34.

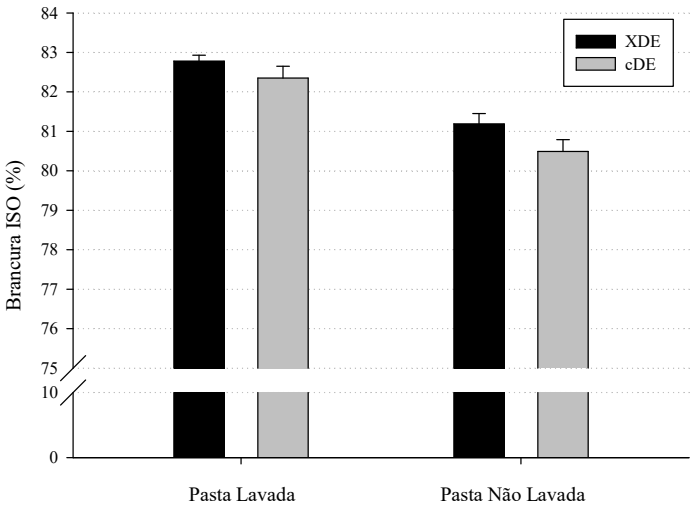


Figura 34 – Comparação da brancura entre a aplicação de uma sequência XDE (50 g/tAD; pH 9; 65ºC; 3,7% ClO_2; 0,36% H_2O_2 e 1,35% NaOH) e cDE (Branco; pH9; 65ºC; 4,1% ClO_2; 0,45% H_2O_2 e 1,5% NaOH).

Na Figura 34, observa-se que a brancura atingida pela sequência XDE_P é superior à da sequência cDE_P, pelo que, para se obter a mesma brancura ISO, é possível ocorrer, em simultâneo, a poupança dos três reagentes de branqueamento, dióxido de cloro, peróxido de hidrogénio e hidróxido de sódio. A poupança destes reagentes pode ser estimada (por defeito) pelas Equações 22 a 24.

$$\text{Poupança } ClO_2(\%)=\frac{4{,}1-3{,}7}{4{,}1}\times 100=9{,}8\% \quad (22)$$

$$\text{Poupança } H_2O_2(\%)=\frac{0{,}45-0{,}36}{0{,}45}\times 100=20\% \quad (23)$$

$$\text{Poupança NaOH } (\%)=\frac{1{,}50-1{,}35}{1{,}50}\times 100=10\% \quad (24)$$

Com a aplicação da xilanase, nas condições referidas acima, é possível obter, pelo menos, uma poupança destes reagentes de cerca de 10%, 20% e 10%, respetivamente. Estes valores são obtidos quer para a pasta lavada quer para a pasta não lavada, mostrando mais uma vez a viabilidade do biobranqueamento usando pasta não lavada e o filtrado de lavagem fabril.

7. Conclusões

O biobranqueamento de pastas cruas, através da aplicação de um tratamento enzimático com xilanase, permite melhorar a deslenhificação da pasta, uma vez que um dos mecanismos de atuação é a hidrólise das xilanas reprecipitadas localizadas na superfície das fibras. Esta atuação permite remover compostos como a lenhina ou ácidos hexenurónicos, que se encontram ligados à xilana, sendo que estes compostos contribuem para a cor das pastas e reversão da brancura. Para além disso, a aplicação da xilanase atua como um *bleach boosting*, uma vez que não é um reagente de branqueamento, mas sim um impulsionador de brancura, promovendo a atuação dos reagentes de branqueamento nos estágios subsequentes. Por estas razões, a aplicação de um tratamento enzimático em pastas cruas de *Eucalyptus globulus* nos primeiros estágios de branqueamento (XDE_P) foi a motivação deste estudo.

Neste trabalho foram usadas duas pastas recolhidas em períodos de tempo e local do processo distintos, denominadas pastas P1 e P2. A pasta P1 foi a que serviu de base para a obtenção das condições mais adequadas para a aplicação do estágio X, fazendo variar o pH, temperatura e carga enzimática, mantendo fixo o tempo de 60 minutos. Ainda nesta pasta, foi aplicada a sequência XDE_P que permitiu, por comparação com as respectivas pastas de controlo (cDE_P), estimar a poupança de dióxido de cloro associada à aplicação do estágio X. No que diz respeito à pasta P2, foi utilizada com o principal objetivo de verificar o efeito do *carryover* da pasta no desempenho da enzima. Nas pastas P2 lavada e não lavada foram aplicadas as sequências de branqueamento XDE_P, para posterior comparação com as pastas de controlo (cDE_P).

Os estágios enzimáticos preliminares permitiram identificar as condições de operação da enzima mais adequadas e que fossem as mais próximas possível da realidade fabril da torre de armazenamento: 65ºC; 8,5; 50 g/tAD e 60 minutos, para a temperatura, pH, carga enzimática e tempo, respetivamente. O pH observado na torre fabril é muito elevado (10,5-11,5), na gama onde a enzima já não apresenta grande eficiência de atuação. O pH mais elevado que aparentou ainda ser adequado para a aplicação da enzima foi 8,5, pelo se selecionou este valor para aplicar o estágio enzimático em ensaios subsequentes. Tendo em consideração a possível aplicação do estágio X noutras unidades industriais (uma vez que a gama de temperaturas da torre de armazenamento da unidade fabril alvo é 60-65ºC), estudou-se a eficiência da enzima para gamas de temperaturas mais elevadas (75 e 85ºC) e compararam-se os resultados com os obtidos para a temperatura de 65ºC. Com os valores obtidos é possível concluir que a xilanase

ainda atua de forma semelhante para a temperatura de 75ºC e perde um pouco de eficiência quando se aplica uma temperatura de 85ºC, em comparação com 65ºC (ambos para um pH de 8,5).

Após a aplicação de uma sequência XDE_P na pasta P1, verificou-se, em relação ao controlo, que o tratamento enzimático promove um ganho de brancura de 2,8 unidades, um aumento da estabilidade de brancura (diminuição do PC number em cerca de 0,2 unidades), um ligeiro aumento na viscosidade e uma remoção de lenhina residual e HexA em cerca de 21 e 7%, respetivamente. Estes valores permitem confirmar a atuação da xilanase na hidrólise parcial das xilanas, quebrando fragmentos que contenham ligações de lenhina-xilana (LCC) ou grupos de ácidos hexenurónicos. O ganho de brancura entre as sequências XDE_P e cDE_P referido acima é superior à diferença entre os valores de brancura entre X e c (2,4 unidades, atribuído exclusivamente à acção da xilanase no estágio X), possivelmente devido ao facto da xilanase alterar a estrutura da fibra, permitindo uma maior atuação dos reagentes de branqueamento nos estágios subsequentes (DE_P). A comparação entre XDE_P e cDE_P permitiu ainda verificar que ocorreu uma perda de rendimento de 1,3% e uma poupança de reagente ClO_2 de 17% no estágio D_0.

Na pasta P2, conclui-se que o *carryover* presente na pasta não lavada não provoca uma inibição na atuação da enzima, visto que o ganho de brancura atingido foi superior no caso da pasta não lavada. Assim, embora a brancura atingida seja inferior, a atuação da enzima aparenta ser mais eficaz nesta pasta. Observou-se ainda uma menor remoção de HexA em relação ao controlo e uma remoção de lenhina ligeiramente superior na pasta não lavada. Por sua vez, a viscosidade e a estabilidade de brancura no tempo foram semelhantes em ambas as pastas (lavada e não lavada). Esta constatação torna-se interessante a nível industrial, visto que é possível a utilização de enzimas com o filtrado de lavagem fabril, reduzindo assim os custos operacionais relacionados com a implementação desta tecnologia.

Também para a pasta P2, verificou-se que a perda de rendimento na sequência XDE_P relação ao controlo é igual para a pasta lavada e não lavada (quando se usou uma carga enzimática de 50 g/tAD). Num estudo adicional, com a aplicação de uma sequência (X: 50 g/tAD, pH 8,5 e 65ºC; D: 3,7% como Cl_2 ativo; E_p: 1,35% NaOH e 0,36% H_2O_2), tendo por comparação uma sequência cDE_p (c: pH 8,5 e 65ºC; D: 4,1% como Cl_2 ativo; E_p: 1,5% NaOH e 045% H_2O_2), verificou-se uma poupança simultânea dos três reagentes de branqueamento em pelo menos 10% em ClO_2 e NaOH e 20% de H_2O_2.

8. Sugestões de Trabalho Futuro

O tempo disponível para a elaboração do presente trabalho não foi suficiente para realizar todos os estudos desejados. Assim propõe-se como trabalho futuro:

- Testar com pasta proveniente do mesmo local (pasta P1) o efeito do tempo na atuação da enzima;
- Testar em sequências XDE_P cargas enzimáticas inferiores a 50 g/tAD e avaliar o seu efeito, uma vez que na pasta P2 o desempenho da enzima foi melhor que o esperado;
- Aplicar os estágios finais, de modo a se ter as sequências completas, tal como na fábrica, e comparar os seus valores, de modo a verificar se o efeito da enzima ainda é notório no final destas;
- Realizar sequências XD e comparar com as sequências XDE_P em termos de desempenho enzimático;
- Realizar uma determinação mais detalhada dos açúcares presentes na pasta, para um maior esclarecimento da atuação da enzima nestes;
- Elaborar curvas de branqueamento para a pasta P2, caso as diferenças entre esta e a pasta P1 se mantenham;
- Realizar um estudo económico, tendo em conta a poupança de reagentes, perda de rendimento e custo de enzima;
- Avaliar as aptidões papeleiras das pastas resultantes, visto que as hemiceluloses são importantes p.e. no processo de refinação.

Bibliografia

Adler, E., 1977. *Lignin Chemistry—Past, Present and Future*. Wood Science and Technology, 11, pp. 169-218.

Ajao, O.; Jeaidi, J.; Benali, M.; Restrepo, A.; El Mehdi, N; Boumghar, Y., 2017. *Quantification and Variability Analysis of Lignin Optical Properties for Colour-Dependent Industrial Applications.* Cellullose, 24, pp. 3703-3723.

Bajpai, P. & Bajpai, P. K., 1997. *Realities and Trends in Enzymatic Prebleaching of KraftPulp*. Em: T. Scheper, ed. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Volume 56. Berlin: Springer-Verlag, pp.1-31.

Bajpai, P. & Bajpai, P., 1992. *Biobleaching of Kraft pulp.* Process Biochemistry, 27(6), pp. 319-325.

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

Bajpai, P., 2012. *Chlorine Dioxide Bleaching.* Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching, pp.135-165.

Bajpai, P.; Anand, A.; Sharma, N.; Mishra, S.; Bajpai, P.; Lachenal, D., 2006. *Enzymes improve ECF bleaching of pulp.* BioResources, 1(1), pp. 34-44.

Baral, P.; Jain, R.; Dixit, A., 2017. *Biobleaching of banana fibre pulp with incorporation of xylanase enzyme from Aspergillus oryzae.* Asian Journal of Environmental Science, 12(1), pp. 48-52.

Beg, Q.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G., 2001. *Microbial xylanases and their industrial applications: a review.* Applied Microbiology and Biotechnology, 56(3-4), pp. 326-338.

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

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

Celbi ©,2018. Todos os direitos reservados. (08-06-2018). Disponível em: http://www.celbi.pt/pt/oeucalipto/20/

Celpa, 2016. Boletim estatístico da indústria papeleira portuguesa. Lisboa.

Cheng, X.; Chen, G.; Huang, S.; Liang, Z., 2013. *Biobleaching Effects of Crude Xylanase from Strptomyces griseorubens LH-3 onEucalyptus kraft Pulp.* BioResources, 8(4), pp. 6424-6433.

Cheng, X.; Chen, G.; Huang, S.; Liang, Z., 2014. *The Biobleaching Effects of Xylanase from Streptomyces griseorubens LH-3 on Bagasse Pulp.* Applied Mechanics and Materials*,* 535, pp. 772-775.

Comlekcioglu, U.; Tutus, A.; Cicekler, M.; Gunes, M.; Aygan, A., 2014. *Application of recombinante xylanase from Orpinomyces sp. in elemental chlorine-free bleaching of kraft pulps.* Romanian Biotechnological Letters, 19(1), pp. 8941-8950.

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

Dyer, T.J., 2004. *Elucidating the Formation and Chemistry of Chromophores during kraft Pulping.* Ph. D. Thesis. Insitute of Paper Science and Technology, Atlanta, GA, USA.

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

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

Esteves, C., 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.

Eugenio, M.; Santos, S.; Carbajo, J.; Martín, J.; Martín-Sampedro, R.; González, A.; Villar, J., 2010. *kraft pulp biobleaching using na extracelular enzymatic fluid produced by Pycnoporus sanguineus.* Bioresource Technology*,* 101, pp. 1866-1870.

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

Ferraz, J., 2013. *Avaliação de tratamentos enzimáticos na estabilidade da Brancura de pastas kraft de eucalipto*. Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.

Ferreira, P. J. T., 2000. *Estudos de pastas kraft de Eucalyptus globulus característicasestruturais e aptidão papeleira,* Tese de Doutoramento: Universidade de Coimbra.

Fillat, A.; Roncero, M.; Vidal, T., 2011. *Assessing the use of xylanase and laccases in biobleaching stages of a TCF sequence for flax pulp.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 86(12), pp. 1501-1507.

Fonseca, S., 2017. *Tratamento enzimático de pasta kraft de Eucalyptus globulus como estratégia inovadora no processo de branqueamento*. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Gangwar, A.; Prakash, N.; Prakash, R., 2014. *Applicability of Microbial Xylanases in Paper Pulp Bleaching: A Review*. BioResources*,* 9(2), pp. 3733-3754.

Gangwar, A.; Prakash, N.; Prakash, R., 2015. *Amenability of acacia and eucalyptus hardwood pulps to elemental chlorine-free bleaching: application and efficacy of microbial xylanase.* BioResources, 10(4), pp. 8405-8413.

García Hortal, J.; Vidal Llucià, T; Colom Pastor, J., 1984. *Blanqueo de pastas en la industria papelera*. Terrassa: Universidad Politecnica de Cataluña.

Ghose, T., & Bisaria, V., 1987. *Measurement of hemicellulase activities part 1: xylanases.* Pure and Applied Chemistry, 59(12), pp. 1739-1752.

Gominho, J., Lourenço, A., Neiva, D., Fernandes, L., Amaral, M., Duarte, A., Simões, R. and Pereira, H., 2015. *Variation of Wood Pulping and Bleached Pulp Properties Along the Stem in Mature Eucalyptus globulus Trees*. Bioresources, 10(4), pp.7808-7816.

Gübitz, G.; Haltrich, D.; Latal, B.; Steiner, W., 1997. *Mode of depolymerisation of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp.* Applied Microbiology and Biotechnology*,* 47(6), pp. 658-662.

Gullichsen, J. & Fogelholm, C-J., 1999. *Fiber line operations (Chapter 2). In: Chemical Pulping*. Volume 1. Universidade da Califórnia. Fapet Oy.

Gupta, V.; Garg, S.; Capalash, N.; Gupta, N.; Sharma, P., 2014. *Production of thermo-alkali-stable laccase and xylanase by co-culturing of Bacillus sp. and B. halodurans for biobleaching of kraft pulp and deinking of waste paper.* Bioprocess and Biosystems Engineering, 38(5), pp. 947-956.

Immanuel, G.; Sanjivkumar, M.; Dhanabalrameshbabu, 2017. *Biobleaching property of β-1,4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium strptomyces olivaceus (MSU3) using pretreated rice straw pulp.* Internacional Journal of Advances in Science Engineering and Technology*,* 5(2), pp. 54-59.

Kapilan, R. & Arasaratnam, V., 2017. *Industrial Applications of Bacterial Xylanases: A Review.* Middle-East Journal of Scientific Research, 25(1), pp. 79-89.

Kumar, S.; Haq, I.; Prakash, J.; Singh, S.; Mishra, S.; Raj, A., 2017. *Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from Bacillus amyloliquefaciens and its application in pre-bleaching of kraft pulp. 3* Biotech, 7(1), pp. 20-31.

Li, J.; Gellerstedt, G.,1997. *The contribution to kappa number from hexenuronic acid groups in pulp xylan.* Carbohydrate Research, 302(3), pp. 213-218.

López, A.; Silva, A.; Santos, E., 2017. *The fungal ability for biobleaching/ biopulping/ bioremediation of lignin-like compounds of agro-industrial raw material*. Química Nova, 40(8), pp. 916-931.

Loureiro, P. E. G., 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.; 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.* Carbohydrate Research*,* 345(10), pp. 1442-1451.

Maalej-Achouri, I.; Guerfali, M.; Romdhane, I.; Gargouri, A.; Belghith, H., 2012. *The effect of Talaromyces thermophilus cellulase-free xylanase and comercial laccase on*

lignocellulosic components during the bleaching of kraft pulp. Internacional Biodeterioration & Biodegradation, 75, pp. 43-48.

Meng, Q.; Fu, S.; Li, B.; Lucia, L., 2015. *The impact of Xylanase and Hot Acid Pretreatment on HexAs in Eucalyptus Kraft Pulp Bleaching.* Journal of Wood Chemistry and Technology. 35, pp. 239-250.

Mustnanta, A.; Fagernäs, L.; Viikari, L., 1995. *Effects of lipases on birch extractives*. Tappi J., 78(2), pp. 140-146.

Nathan, V.; Rani, M.; Rathinasamy, G.; Dhiraviam, K., 2017. *Low Molecular Weight Xylanase from Trichoderma víride VKF3 for Bio-bleaching of Newspaper* Pulp. BioResources*,* 12(3), pp. 5264-5278.

Neto, C. P.; Evtuguin, D., Furtado, F.; Sousa, A. M., 2002. *Effect of Pulping Conditions on the ECF Bleachability of Eucalyptus globulus Kraft Pulps.* Industrial & Engineering Chemistry Research, 41(24), pp. 6200-6206.

Neto, C. P.; Evtuguin, D.; Pinto, P; Silvestre, A.; Freire, C., 2005; *Química da madeira de Eucalyptus globulus: Especificidades e impacto nos processos de cozimento e branqueamento.* Pasta e Papel, pp. 32-42.

Novozymes, 2014. *Improving eucalyptus pulp bleachability with the next generation biotechnology*. Apresentação Novozymes.

Pedroso, A. I. & Carvalho, M. G., 2003. *Alkaline pulping of Portuguese Eucalyptus globulus: Effect on hexenuronic acid content.* Journal of Pulp and Paper Science*,* 29(5), pp. 150-154.

Pettersen, R., 1984. *The Chemical Composition of Wood.* Advances in Chemistry, pp. 57-126.

Pinheiro, C., 2014. *Aplicação de xilanases em pastas kraft não branqueadas de eucalipto*. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

Polizeli, M.; Rizzatti, A.; Monti, R.; Terenzi, H.; Jorge, J.; Amorim, D., 2005. *Xylanases from fungi: properties and industrial applications.* Applied Microbiology and Biotechnology, 67(5), pp. 577-591.

Quintana, E.; Valls, C.; Barneto, A.; Vidal, T.; Ariza, J.; Roncero, M., 2015. *Studying the effects of laccase treatment in a softwood dissolving pulp: Cellulose reactivity and crystallinity.* Carbohydrate Polymers, 119, pp. 53-61.

Quintana, E.; Valls, C.; Vidal, T., Roncero, B., 2013. *An enzyme-catalysed bleaching treatment to meet dissolving pulp characteristics for celulose derivatives applications.* Bioresource Technology*,* 148, pp. 1-8.

Rosenau, T.; Potthast, A.; Kosma, P.; Suess, H.; Nimmerfroh, N., 2008. *Chromophores in aged hardwood pulp—their structure and degradation potential.* Tappi J, 1, pp. 24–30.

Rowell, R., 2005. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Santos, A.; Rodríguez, F.; Gilarranz, M.; Moreno, D.; García-Ochoa, F., 1997. *Kinetic Modeling of Kraft Delignification of Eucalyptus globulus.* Industrial & Engineering Chemistry Research, 36(10), pp. 4114-4125.

Sharma, M. & Kumar, A., 2013. *Xylanases: An Overview.* British Biotechnology Journal, 3(1), pp. 1-28.

Sharma, P. K., 2017. *Xylanases current and future perspectives: a review.* Journal on New Biological Reports, 6(1), pp. 12-22.

Shatalov, A. & Pereira, H., 2008. *Effect of xylanases on peroxide bleachability of eucalypt (E. globulus) kraft pulp,* Biochemical Engineering Journal*,* 40(1), pp. 19-26.

Shatalov, A. & Pereira, H., 2009. *Impacto f hexenuronic acids on xylanase-aided bio-bleaching of chemical pulps.* Bioresource Technology*,* 100, pp. 3069-3075.

Silva, N.; Simões, M.; Knob, A.; Moraes, S.; Henn, C.; Silva, J.; Simão, R.; Maller, A.; Kadowaki, M., 2016. *Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from Penicillium crustosum FP 11 isolated from the Atlantic forest.* Biocatalysis and Biotransformation*,* pp. 1-9.

Silva, V.; Lino, A.; Ribeiro, R.; Colodette, J.; Forsström, A.; Wackerberg, E., 2011. *Factors affecting brightness reversion of hardwood kraft pulps.* BioResources, 6(4), pp. 4801-4814.

Simeonova, G.; Sjodahl, R.; Ragnar, M.; Lindstrom, M. E.; Henriksson, G., 2007. *On the effect of a xylanase post-treatment as a means of reducing the yellowing of bleached hardwood kraft pulp*. Nordic Pulper and Paper Research Journal*,* 22(2), pp. 172-176.

Singh, G.; Kaur, K.; Puri, S.; Sharma, P., 2014. *Critical factors affecting laccase-mediated biobleaching of pulp in paper industry.* Applied Microbiology and Biotechnology, 99(1), pp. 155-164.

Sintra, T., 2015. *Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio.* Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

Sixta, H., 2006. *Handbook of pulp*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA.

Sjöström, E., 1993. *Wood chemistry: Fundamentals and Applications*. 2ª ed. San Diego, California: Academic Press.

Smook, G.& Kocurek, M., 1982. *Kraft Pulping (Chapter 7). In: Handbook for Pulp & Paper Technologists*. *1st ed*. Atlanta, GA, USA: TAPPI.

Sousa, J., 2012. *Avaliação de um tratamento redutor e enzimático no branqueamento final de pastas kraft de eucalipto.* Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

Sousa, J.; Moura, A.; Evtuguin, D.; Carvalho, M., 2015. *Enzymatic treatment applied as a final stage in E. globulus kraft pulp bleaching.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 91(2), pp. 547-554.

Subramaniyan, S. & Prema, P., 2002. *Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application.* Critical Reviews in Biotechnology, 22(1), pp. 33-64.

Suess, H. U., 2010. *Pulp Bleaching Today.* Berlin: Walter de Gruyter.

Thakur, V.; Jain, R.; Mathur, R., 2012. *Studies on xylanase and laccase enzymatic prebleaching to reduce chlorine-based chemicals during CEH and ECF bleaching.* BioResources*,* 7(2), pp. 2220-2235.

The Navigator Company ©, 2018. All rights reserved. (08-06-2018) Disponível em: http://www.thenavigatorcompany.com/Sustentabilidade/Floresta-Sustentavel/Eucalipto

Tolan, J. S.; Olson, D.; Dines, R. E., 1996. *Survey of mil usage of xylanase,* Em: Jeffries, T.W., Viikari, L. (eds.), Enzymes for Pulp and Paper Processing*,* ACS Symposium Series 655, American Chemical Society, Washington, D. D., pp. 25-35.

Valenzuela, S.; Valls, C.; Roncero, M.; Vidal, T.; Diaz, P.; Pastor, F., 2013. *Effectiveness of novel xylanases belonging to diferente GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres*. J Chem Thechnol Biotechnol*,* 89, pp. 401-406.

Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M., 1994. *Xylanases in bleaching: From an idea to the industry.* FEMS Microbiology Reviews, 13(2-3), pp. 335-350.

Viikari, L.; Ranua, M.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M., 1986. *Bleaching with enzymes*. Proceedings of the 3rd Internacional Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm, Sweden, pp. 67-69.

Vuorinen, T.; Fagerström, P.; Räsänen, E.; Vikkula, A.; Henricson, K.; Teleman, A., 1997. *Selective Hydrolysis of hexenuronic acid groups opens new possibilities for development of bleaching processes.* Proc. 9th Internacional Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Montreal, pp. 1-4.

Walia, A.; Guleria, S.; Mehta, P.; Chauhan, A; Parkash, J, 2017. *Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review.* 3 Biotech, 7(1), pp. 11-22.

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

Wu, H.; Cheng, X.; Zhu, Y.; Zeng, W.; Chen, G.; Liang, Z., 2017. *Purification and characterization of cellulase-free, thermostable endo-xylanase from Streptomyces griseorubens LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp.* Journal of Bioscience and Bioengineering*,* 125(1), pp. 46-51.

Zheng, H.; Liu, X.; Han, Y.; Wang, J.; Lu, F., 2012. *Overexpression of a Paenibacillus campinasensis xylanase in Bacillus megaterium and its applications to biobleaching of cotton stalk pulp and saccharification of recycled paper sludge*. Bioresource Technology, 125, pp. 182-187.

Anexos

Anexo I. Diagrama simplificado do processo

Na Figura I encontra-se esquematizado o diagrama simplificado do processo da zona de lavagem da fábrica, que segue o cozimento, mas antecipa o branqueamento. Neste local procedeu-se à recolha das duas amostras de pasta utilizadas no presente trabalho, tal como indicadas na Figura I.

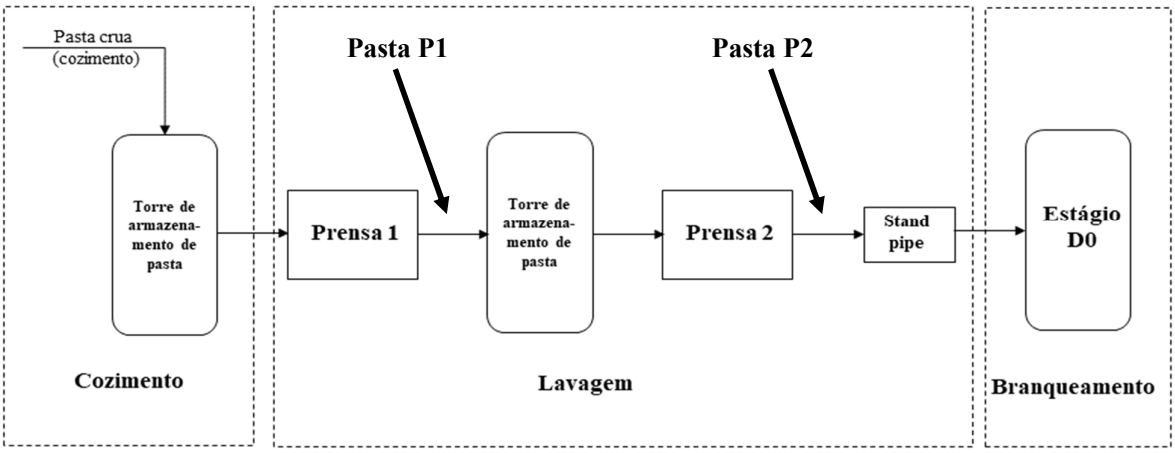


Figura I – Diagrama de processo simplificado da zona de recolha das pastas utilizadas.

Anexo II. Metodologias experimentais detalhadas

II.1. Determinação da atividade enzimática da xilanase

Reagentes:

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

Preparação Reagentes:

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

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

Reagente DNS:

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

  192 g tartarato duplo de sódio de potássio

  10 g de hidróxido de sódio

  10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico

  2 g de fenol

  0,5 g de sulfito de sódio

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

Xilana:

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

Xilose:

- 1000 µg de xilose por mL de água.

Curva de Calibração:

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

Tabela I – Quantidades necessárias para a elaboração da curva de calibração para a determinação da atividade enzimática.

Xilose (mL)	*Água (mL)*	*Tampão (mL)*
1,0	1,0	1,0
0,8	1,2	1,0
0,6	1,4	1,0
0,4	1,6	1,0
0,2	1,8	1,0
0,0	2,0	1,0 (branco)

- Adicionar 3 mL de DNS a cada tubo, agitar e colocá-los num banho de água a ferver durante 15 min.

- Colocar os tubos em gelo, durante aproximadamente 5 min.
- Ler a absorvância no espectrofotómetro a 640 nm em cuvetes, começando pelo branco (que não contém xilose). Fazer a curva de calibração com os valores da absorvância.

Diluição da solução enzimática:

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

Teste:

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

Conversão dos açúcares redutores em actividade da xilanase:

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

II.2. Preparação dos ensaios

No saco de plástico são introduzidos os reagentes correspondentes ao estágio de branqueamento que se pretende efetuar – solução enzimática ou Dióxido de Cloro (ClO_2) ou Peróxido de Hidrogénio e Hidróxido de Sódio (H_2O_2 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:

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

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

II.2.1. 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 ºC ± 1 ºC durante um período mínimo de 4 horas e um máximo de 24 horas. Colocar a caixa, agora tapada, num exsicador 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.

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

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.2.2. Cálculo da quantidade de reagentes

<u>Solução Enzimática</u>

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:

$$V_{\text{enzima}}(mL_{\text{enzima}}) = \frac{\text{dose enzimática } (mL_{\text{enzima}}) \times 20\ (g_{\text{pasta seca}})}{0{,}9 \times 10^{6}\ (g_{\text{pasta seca}})} \qquad \text{(IV)}$$

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 1:10000 ou 1:5000, dependendo da carga enzimática aplicada, em tampão McIlvaine. O volume de solução enzimática a medir deve ter em conta esta diluição:

$$V_{\text{solução enzimática}} = V_{\text{enzima}} \times \text{fator de diluição} \quad \text{(V)}$$

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

ClO_2 ou H_2O_2 e NaOH

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

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

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

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

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, a massa de suspensão de 200 g.

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

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.2.3. 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). Este pode ser preparado para uma gama de pH de 4 a 11,6.

De modo a obter o pH desejado, deve-se misturar a parte A e B segundo as razões indicadas na Tabela III. Para a preparação de cada uma das partes, deve-se pesar as quantidades

apresentadas na Tabela II, colocar num balão de diluição de 1L e perfazer com água destilada até à marca.

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

			M (g/mol)	Massa (g)	Pureza (%)
Parte A	0,04 M H3PO4	Ácido Orto-fosfórico	98,00	4,61	85
	0,04 M CH3COOH	Ácido Acético	60,05	2,40	100
	0,04 M H3BO3	Ácido Orto-bórico	61,83	2,47	100
Parte B	0,2 M NaOH	Hidróxido de Sódio	40,00	8,00	100

Tabela III – Preparação de tampão B-R a um determinado pH.

pH	Parte A (L)	Parte B (L)
7	0,656	0,344
8	0,624	0,376
9	0,596	0,406
10	0.562	0.438

Para ajustar o pH final adicionar alguma quantidade da parte A ou parte B, se se pretender diminuir ou aumentar o pH.

II.2.4. Determinação da concentração de dióxido de cloro concentrado

A determinação da concentração de ClO_2 é efetuada por iodometria, sendo o iodo libertado titulado com tiossulfato de sódio:

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \Leftrightarrow 2I^- + S_4O_6^{2-} \qquad (X)$$

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 ClO_2 em gelo.
- Solução de iodeto de potássio KI, a 10% (volume)
- Solução tampão de borato (pH=8,3)
- Solução de tiossulfato de sódio, 0,1M (padronizada) ou 0,05 M
- Solução de ácido clorídrico, 2 mol/L
- Indicador de cozimento de amido
- Cloreto de titânio a 1,5% (diluir 10x a solução comercial de 15%, da Merck B406407 946, 500 mL)

Material

- Bureta normal ou automática
- Medidor de pH
- Pipeta de 5,0 mL
- Copos de 250 mL
- Agitador magnético/magnetes
- Pipetas Pasteur
- Provetas de 25 e 50 mL
- 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 (~3xpipetas 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 ClO_2 e converter em volume com a densidade (pesa-se, numa balança analítica de precisão 0,0001g, um determinado volume conhecido da solução de ClO_2 (5 mL ou 10 mL, por exemplo); a densidade é calculada fazendo a razão entre a massa e o volume). Ocorrem as seguintes reações:

$$Cl_2 + H_2O \Leftrightarrow HOCl + H^+ + Cl^- \text{ (se houver cloro em solução)} \quad \text{(XI)}$$

$$HOCl + H^+ + 2\,I^- \Leftrightarrow Cl^- + I_2 + H_2O \quad \text{(XII)}$$

$$ClO_2 + I^- \Leftrightarrow ClO_2^- + \tfrac{1}{2}I_2 \quad \text{(XIII)}$$

- O iodo libertado é titulado com tiossulfato de sódio adicionando-se 1 ml de cozimento de amido como indicador após a solução ficar amarelo claro. O volume de tiossulfato 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:

$$ClO_2^- + 4I^- + 4H^+ \Leftrightarrow Cl^- + 2I_2 + 2H_2O \quad \text{(XIV)}$$

- A solução fica novamente violeta, e o iodo libertado é titulado com tiossulfato 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:

$$ClO_3^- + 2Ti^{3+} + 3H_2O \Leftrightarrow ClO_2^- + 2TiO_2 + 6H^+ \quad \text{(XV)}$$

$$ClO_2^- + 4I^- + 4H^+ \Leftrightarrow Cl^- + 2I_2 + 2H_2O \qquad \text{(XVI)}$$

- O iodo libertado é titulado com tiossulfato 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:

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

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:

$$C_{ClO_2} = 67{,}5 \cdot M \cdot \frac{V_1}{V_a} \quad (g/l) \qquad \text{(XVIII)}$$

$$C_{ClO_2^-} = 67{,}5 \cdot M \cdot \frac{(V_2 - 4 \cdot V_1)}{4 \cdot V_a} \quad (g/l) \qquad \text{(XIX)}$$

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:

$$C_{ClO_2} = 67{,}5 \cdot M \cdot \frac{V_2}{4 \cdot V_a} \quad (g/l) \qquad \text{(XX)}$$

$$C_{Cl_2} = 71 \cdot M \cdot \frac{\left(V_1 - \frac{V_2}{4}\right)}{2 \cdot V_a} \quad (g/l) \qquad \text{(XXI)}$$

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

$$C_{ClO_3^-} = 1000 \cdot M \cdot \frac{V_3}{4 \cdot V_a} \cdot 83{,}5 \quad (mg/l) \qquad \text{(XXII)}$$

Para as expressões acima descritas foram utilizadas as seguintes notações:

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

V_a = Volume de amostra (titulado), mL;

V_1, V_2, V_3 = Consumo de tiossulfato de sódio em cada titulação, mL.

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

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

Para converter $gClO_2/L$ em gCl_2 ativo/L multiplica-se o primeiro por 2,63.

II.2.5. Preparação da Solução de NaOH

Reagentes

- NaOH pó/pellets;
- Cloreto de bário a 20% (w/w);
- Ácido clorídrico (0.5M).

Material

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

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

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

Preparação do ácido clorídrico 0,5M padrão

Adicionar o conteúdo de uma ampola de HCl 0,5 M 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.

- Colocar no TITRINO a solução de HCl (0,5 M);

- Colocar num copo 25 mL da solução de NaOH diluído e adicionar 15 mL de cloreto de bário, para precipitar os carbonatos existentes na solução;

- Colocar o copo no TRITINO com um magnete;

- Ligar a agitação e adiciona-se gotas de indicador fenoftaleína. De seguida, começa-se a titulação.

- A titulação dá-se por terminada quando se visualizar a mudança de cor de cor-de-rosa para incolor;

- Efetuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0.5ml de volume de titulante).

Cálculos

Cálculo da concentração de NaOH na solução original:

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

em que [HCl] = 0,5 mol/L e V_{HCl} é o volume gasto de titulante, em mL; o fator de diluição é 1; V_{toma} = 25 mL; a massa molar M (NaOH) = 40 g/mol permite expressar a concentração em g/L

II.2.6. 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:

$$H_2O_2 + 2KI + H_2SO_4 \Leftrightarrow K_2SO_4 + 2H_2O + I_2 \qquad \text{(XXIV)}$$

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \Leftrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6 \qquad \text{(XXV)}$$

Reagentes

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

Material

- Titrino
- Elétrodo 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 $Na_2S_2O_3$ (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 (10 mL de filtrado sem diluição) 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;

- Registar 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:

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

em que $[Na_2S_2O_3]$ = 0,1 mol/L e $V_{Na_2S_2O_3}$ é o volume gasto de titulante, em mL; o factor de diluição é (500/25) = 20 (no caso do filtrado é 1); V_{toma} = 10 mL; a massa molar M (H_2O_2) = 34 g/mol permite expressar a concentração em g/L; o factor ½ respeita a estequiometria da reação de titulação: $n(H_2O_2):n(Na_2S_2O_3)$ = 1:2. Numa forma condensada tem-se:

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

II.3. Metodologia experimental de branqueamentos

Material

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

Reagentes

- Estágio X: solução enzimática e tampão B-R;
- 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 ser determinada a massa de enzima a adicionar, determinar a massa de tampão necessário ao branqueamento e pesar esse valor num gobelé. Colocar a solução enzimática e o Tampão B-R num frasco de vidro com tampa, agitar, e colocar no banho a aquecer durante 20 minutos. Após este tempo 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. Registar os valores exatos. 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 bem 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 o auxílio de um filtro de placa porosa. Guardar o filtrado num frasco tapado em gelo para posterior análise.
- Lavar a pasta com 3 litros de água destilada, a uma temperatura de 35ºC, 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 iniciar o procedimento de branqueamento novamente caso se pretenda prosseguir na sequência de branqueamento.

II.4. Cálculo da atividade enzimática em diferentes unidades

Tabela IV – Dados para as conversões.

Actividade de solução enzimática (U/mL)	36090
Massa volúmica da solução enzimática (g/mL)	1,0772
Dose aplicada para as condições óptimas (g/tAD)	50
Massa de pasta absolutamente seca usada nos ensaios (g)	20

➢ <u>Determinação da massa de solução de enzima correspondente à dose aplicada:</u>

A dose aplicada nos ensaios finais foi 50 g/tAD, onde tonelada "*air dry*" significa que a pasta apresenta um teor de 10% de humidade, isto é, têm-se 50 g de solução enzimática por cada 0,9 t de pasta seca. Como nos ensaios realizados se utilizou uma base de 20 g de pasta seca, tem-se:

$$m_{solução\ enzima} = \frac{50\ \left[g_{solução\ enzima}\right] \times 20\ [g_{pasta}]}{1 \times 10^{6} \times 0{,}9\ [g_{pasta}]} = 1{,}11 \times 10^{-3}\ \left[g_{solução\ enzima}\right] \qquad \text{(XXVIII)}$$

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

- Conversão de dose enzimática em carga aplicada:

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

$$\text{Carga}\left[g_{\text{solução enzima}}/g_{\text{pasta}}\right] = \frac{m_{\text{solução enzima}}\left[g_{\text{solução enzima}}\right]}{m_{\text{pasta seca}}\left[g_{\text{pasta}}\right]} \times 100 \qquad \text{(XXIX)}$$

Para 20 g de pasta seca e 50 g/tAD, tem-se:

$$\text{Carga (\%)} = \frac{1{,}11\text{x}10^{-3}\left[g_{\text{solução enzima}}\right] \times 100}{20\left[g_{\text{pasta}}\right]} = 0{,}00556\ \%\ \left[g_{\text{solução enzima}}/g_{\text{pasta}}\right] \qquad \text{(XXX)}$$

- Conversão de carga em unidades de atividade enzimática por grama de pasta:

A actividade enzimática determinada apresenta-se em unidades de atividade por mililitro de solução enzimática; para cada ensaio realizado é necessário saber o número de unidades de atividade por grama de pasta seca.

$$\text{Atividade}\left[U/g_{\text{solução enzima}}\right] = \frac{\text{Actividade}\ \left[U/mL_{\text{solução enzima}}\right]}{\rho_{\text{solução enzima}}\left[g_{\text{solução enzima}}/mL_{\text{solução enzima}}\right]} \qquad \text{(XXXI)}$$

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

$$\text{Atividade} = \frac{36090\left[U/mL_{\text{solução enzima}}\right]}{1{,}0772\left[g_{\text{solução enzima}}/mL_{\text{solução enzima}}\right]} = 33503\left[U/g_{\text{solução enzima}}\right] \qquad \text{(XXXII)}$$

Convertendo em unidades de atividade por grama de pasta:

$$\text{Carga}\left[U/g_{\text{pasta}}\right] = \frac{\text{Actividade}\left[\frac{U}{g_{\text{solução enzima}}}\right] * m_{\text{solução enzima}}\left[g_{\text{solução enzima}}\right]}{m_{\text{pasta}}\left[g_{\text{pasta}}\right]} \qquad \text{(XXXIII)}$$

$$\text{Carga} = \frac{33503\left[\frac{U}{g_{\text{solução enzima}}}\right] * 1{,}11\text{x}10^{-3}\left[g_{\text{solução enzima}}\right]}{20\left[g_{\text{pasta}}\right]} = 1{,}86\left[U/g_{\text{pasta}}\right] \qquad \text{(XXXIV)}$$

II.5. Filtrados residuais

II.5.1. Determinação da concentração residual de ClO_2

A determinação do ClO_2 residual é semelhante ao apresentado para a determinação da concentração de ClO_2 concentrado apresentado no Anexo II.2.4.

II.5.2. Determinação da concentração residual de H_2O_2

A determinação do H_2O_2 residual é semelhante ao apresentado para a determinação da concentração de H_2O_2 concentrado apresentado no Anexo II.2.6.

II.5.3. Determinação da concentração residual de NaOH

Para a determinação da quantidade de OH^- residual é necessário efetuar-se uma titulação ácido/base ao licor (filtrado).

Materiais

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

Reagentes

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

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

Numa balança, colocar um copo de 2 litros e pesar 244,27 g de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ e adicionar água destilada até obter 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, 30 mL de filtrado e 10 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 V:

Tabela V – 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_{BaCl2} (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 filtrada para um copo+magnete;
- Colocar no TITRINO a solução de HCl (0,01 M);
- Introduzir o eléctrodo de pH no suporte do TITRINO, ligá-lo ao aparelho de análise e colocá-los em água destilada;
- No TITRINO, usando o teclado, premir User method (3) → Recall method → Enter;
- Escolher o método pretendido, premindo repetidamente Select até se visualizar no ecrã "NaOH PGL" → Enter;
- Colocar o copo no TRITINO, introduzindo o eléctrodo com o cuidado de submergir a cabeça do eléctrodo sem tocar no magnete;
- Ligar a agitação e premir START para dar início à titulação;
- Quando a curva de titulação estabilizar (aparece EP1) e o TITRINO automaticamente terminará a titulação;
- Premir Select até aparecer Fix EP's → premir Enter; registar o valor do volume gasto de titulante até um pH=8,6 (o método seleccionado faz automaticamente esta avaliação);
- Efectuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0.5 mL de volume de titulante).

Cálculos:

Cálculo da concentração de OH^- no licor residual.

$$[NaOH]_R(mol/L) = \frac{V \times [HCl]}{} \times \frac{V_t}{V_f} \qquad \text{(XXXV)}$$

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

II. 6. Caracterização de pastas

II.6.1. 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, o consumo 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 o índice kappa da pasta é determinado a partir do número de mililitros de uma solução de permanganato de potássio 0,1N 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:

$$MnO_4^- + \text{lenhina} \rightarrow Mn^{2+} + \text{lenhina oxidada} \qquad (Mn^{7+} + 5e^- \rightarrow Mn^{2+}) \qquad \text{(XXXVI)}$$

$$2MnO_4^- + 16H^+ + 10I^- \leftrightarrow 2Mn^{2+} + 8H_2O + 5I_2 \qquad (10I^- \rightarrow 5I_2 + 10e^-) \qquad \text{(XXXVII)}$$

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

$$2S_2O_3^{2-} + I_2 \leftrightarrow S_4O_6^{2-} + 2I^- \qquad (4S^{2+} \rightarrow 2S^{2+} + 2S^{3+} + 2e^-) \qquad \text{(XXXVIII)}$$

$$\text{Soma:} \quad 2MnO_4^- + 16H^+ + 10S_2O_3^{2-} \leftrightarrow 2Mn^{2+} + 5S_4O_6^{2-} \qquad \text{(XXXIX)}$$

(por cada mol de MnO_4^- consome-se 5 moles de $S_2O_3^{2-}$ i.e. $5e^-$/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 tiossulfato de sódio (VB mL). O índice kappa, baseado na norma citada, é dado por:

$$IK = C*d/W \qquad (XL)$$

No procedimento seguido no DEQ, denominado "Micro-kappa", são usados menos quantidade de reagentes e de menor concentração em relação ao referido na norma NP3l86, onde **d** é o fator de correção para um consumo de 50% de permanganato (ver Tabela V), o qual depende do valor de $C = 0,5*(VB - Vt)*[Na_2SO_3]/(5*[KMnO_4])$; 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 eu 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):

$$LT\ (em\ \%) = 0,15*IK \qquad (XLI)$$

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

$$LT\ (\%) = 0,187*IK — 0,75 \quad (R^2=0,9900) \qquad (XLII)$$

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

<u>Reagentes:</u>

- 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 tiossulfato 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 H_2SO_4 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 $Na_2S_2O_3$ 0,05N:

- Introduzir o conteúdo de uma ampola de Tiossulfato 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 d 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 mo1/L);

- Titular o iodo libertado com tiossulfato 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 VI – Fator Fator d. Equação equivalente: d = (0,89301 + 0,021456*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.6.2. Determinação de ácidos hexenurónicos (HexA)

A determinação do teor de HexA foi realizado de acordo com Pedroso e Carvalho (2003).

Reagentes:

- Solução de cloreto de mercúrio (22mmol/L ou 0,6%) / acetato de sódio (0,7%, para manter pH em 6-7): pesar 6 g de $HgCl_2$ e 7 g de CH_3COONa e dissolver em água destilada.

Perfazer 1000ml. Guardar em local escuro, à temperatura ambiente. Não utilizar se apresentar alguma precipitação.

Procedimento Experimental

1 – Colocar a pasta a secar ao ar durante, aproximadamente, 3 dias. Determinar o seu teor de humidade.

2 - Pesar ~0,15g (o.d.) de pasta crua (ou ~0,6 g de pasta branca) para frascos de vidro escuro. Para cada amostra são feitas 3 réplicas;

3 - Colocar em cada frasco 40 ml de solução de cloreto de mercúrio / acetato de sódio; Agitar no vortex durante 2 minutos;

4 - Colocar os frascos num banho térmico a 70°C com agitação de 38-40 rpm, durante 70 minutos (condições estudadas por Pedroso e Carvalho, 2003 – Figura 1);

5 - Retirar as amostras do banho e colocá-las numa mistura de água e gelo durante 5 minutos;

6 - Transferir alguma quantidade dos frascos de vidro escuro para tubos de ensaio pequenos;

7 - Centrifugar as amostras durante 5 minutos a 2700 rpm;

8 - Pipetar o liquido centrifugado e filtrá-lo para a célula de quartzo e ler a absorvância no espectrofotómetro nos comprimentos de onda de 260 nm e de 290 nm usando como branco a solução de cloreto de mercúrio/ acetato de sódio. (Diminuir a quantidade de pasta caso a absorvância a 260 nm seja superior a 1,6).

Cálculos:

O teor de HexA é dado pela expressão:

$$C_{HexA}\left(mmol\ /\ kg\right) = \frac{0.287 \times \left(A_{260} - 1.2 \times A_{290}\right) \times V_{hidrolisado}}{m} \qquad \text{(XLIII)}$$

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).

II.6.3. 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 [η], definida por:

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

onde $\eta_{rel} = \eta/\eta_0$, 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:

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

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 [η]C, conforme proposto por Martin. A escolha deste valor, que segundo as normas referidas deve ser [η]C = 3,0 ± 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 [η]C é o mais próximo possível de 3,0 (3,0±0,1), especialmente para valores de [η] superiores a 1100 mL/g, devendo a viscosidade ser determinada a um gradiente de $200 \pm 30 s^{-1}$ num viscosímetro de dimensões perfeitamente definidas (volume de 1,0 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

25ºC), 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 [η]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.

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 VII.

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

Índice de viscosidade limite ou viscosidade intrínseca (dm^3/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 ±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 ± 0,1ºC (~5 min); (no Inverno, usar primeiro água quente (40- 50ºC) 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 ± 0,2 s. Efetuar pelo menos duas medições que sejam concordantes, ± 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 VIII para obter o valor do produto c[η] 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[η] estiver fora do intervalo 3 ± 0,1.

Tabela VIII – Produto c[η] correspondente a diferentes rácios de viscosidade ($\eta_{rácio}$).

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

II.6.4. Preparação de folhas para medição de Brancura ISO

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

Procedimento:

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

- Num copo de vidro junta-se a pasta pesada com 1L de água destilada e 2 mL de EDTA, e deixa-se desintegrar durante 30 minutos, com auxílio de um agitador;

- Com a ajuda de um medidor de pH (com leitura a 0,1 unidades), verifica-se se o pH da suspensão obtida é aproximadamente 5 (4,9 - 5). Caso não esteja, ajusta-se o pH a este intervalo por meio de adições de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L ou de solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, agitando sempre cuidadosamente com o eléctrodo;

- Depois de acertado o pH, agitar bem a suspensão (pode agitar-se cuidadosamente com o eléctrodo) e dividir em duas porções idênticas (2 x 500 mL), contendo cada uma 2 g de pasta seca;

- Colocar um papel de filtro espesso no funil de *Bückner* (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.

Anexo III – Resultados Experimentais Obtidos

Nesta secção encontra-se os resultados experimentais obtidos ao longo de todo o trabalho. Não só são apresentados os valores citados no corpo de texto como todos os outros obtidos, e no qual, devido à limitação de páginas da dissertação não foram apresentados no corpo de texto da mesma.

III.1. Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade enzimática, recorreu-se ao método proposto por Ghose & Bisaria (1987). Este método baseia-se na medição, através do reagente DNS, de xiloses equivalentes libertadas da xilana como resultado da ação da enzima durante 60 minutos. Como primeiro passo, elaborou-se a curva de calibração, onde se usou uma xilose padrão em diferentes quantidades. Tendo-se obtido os valores de absorvância em função da xilose libertada apresentados na Tabela IX.

Tabela IX – Valores obtidos para a construção da curva de calibração.

[Xilose] (mg/mL)	Absorvância
0,2	0,038±0,015
0,4	0,112±0,007
0,6	0,206±0,007
0,8	0,272±0,021
1,0	0,370±0,004

Com os valores obtidos e apresentados na Tabela VIII, procedeu-se à elaboração da curva de calibração, para posterior determinação da xilose libertada devido à presença da enzima. A curva de calibração obtida encontra-se na Figura II.

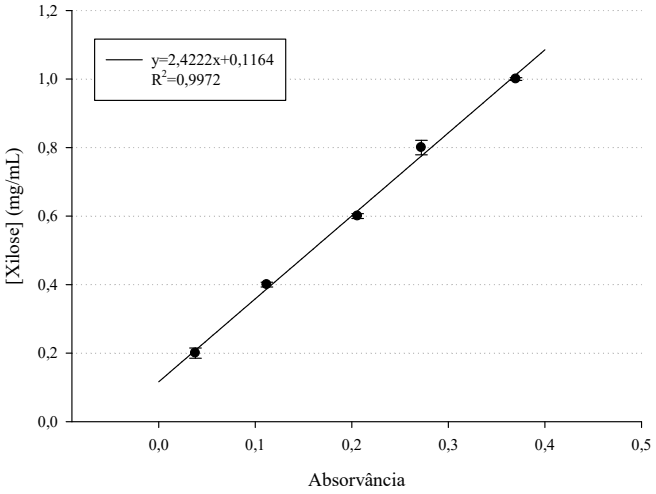


Figura II – Curva de calibração obtida para a determinação da atividade enzimática.

Para os testes realizados com enzima, leu-se a absorvância e de seguida determinou-se a quantidade de açúcares redutores libertados por mL de preparação de enzima. De notar que para estas preparações foi necessário proceder a diversas diluições de enzima (p.e. 1000; 10000: 100000), de modo a que ocorra uma libertação de açúcares dentro da gama 300-800 µg durante os 60 minutos. Se a quantidade de xilose libertada fosse menor ou maior que os limites da gama, procedia-se a novos testes, com menor ou maior diluição, respetivamente.

Com a quantidade de xilose libertada foi necessário recorrer a uma curva padrão da atividade da xilanase (Figura III), disponibilizada por Ghose & Bisaria (1987). Onde o tempo de incubação (t_s, tempo requerido para 1 mL de uma enzima padrão libertar a mesma quantidade de µg de xilose equivalentes para 1 mL de uma solução enzimática desconhecida durante 60 minutos) encontra-se representado em função da concentração de xilose.

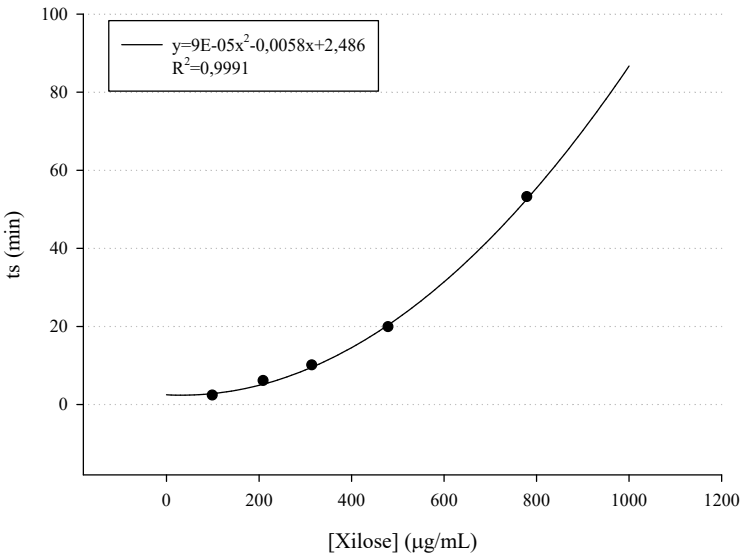


Figura III – Curva padrão da atividade da xilanase.

Por fim, a atividade enzimática, em miliunidades por mL de solução enzimática, foi calculada conforme a Equação XLVI.

$$A_u\ (mU/mL) = \frac{A_s \times t_s \times D_u}{t_u} \qquad \text{(XLVI)}$$

Onde:

- A_s – Atividade de uma enzima padrão (217 mU/mL);
- t_u – Tempo de incubação da preparação enzimática desconhecida (60 min);
- D_u – Fator de diluição da preparação enzimática.

III.2. Desempenho da Enzima em Diferentes Condições Operatórias na Pasta P1

Tabela X – Condições utilizadas no tratamento enzimático na Pasta P1 e respetivos resultados obtidos.

Temperatura (ºC)	Carga Enzimática (g/tAD)	pH	Abs 280 nm	Abs 457 nm	Rendimento (%)	IK	HexA (mmol/kg)	IK corrigido	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)
60	70	6,8	0,3883	0,3472	96,56	12,76	44,24	8,78	1264	41,53
	100	6,9	0,3106	0,2939	97,46	12,50	43,25	8,61	1263	41,89
	0 (Controlo)	6,9	0,0953	0,0713	99,11	14,11	48,08	9,84	1261	39,27
	70	7,5	0,4203	0,3937	98,72	13,27	43,65	9,34	1225	41,79
	100	7,6	0,3665	0,3566	97,08	13,18	43,86	9,23	1268	42,14
	0 (Controlo)	7,6	0,1221	0,0912	100	14,60	51,26	9,99	1245	39,10
	70	8,4	0,3482	0,4356	96,99	12,81	49,12	8,38	1251	42,02
	100	8,4	0,3407	0,4260	98,41	13,04	46,54	8,85	1261	42,11
	0 (Controlo)	8,5	0,1277	0,1391	100	14,38	52,60	9,65	1235	39,26
65	35	6,9	0,2825	0,2737	96,61	13,22	49,45	8,76	1284	41,60
	50	6,9	0,2832	0,2816	97,95	12,66	45,30	8,59	1249	42,22
	70	6,8	0,4744	0,4144	97,59	12,38	46,79	8,17	1289	41,53
	100	6,9	0,3810	0,3607	97,63	12,37	44,42	8,37	1271	42,16
	0 (Controlo)	6,9	0,1004	0,0847	100	14,13	53,48	9,31	1235	39,30
	70	7,5	0,4410	0,4540	97,73	12,45	45,71	8,33	1279	42,18
	100	7,6	0,4156	0,4427	97,48	12,15	44,65	8,13	1253	42,20
	0 (Controlo)	7,6	0,1110	0,0830	99,78	13,90	56,30	8,83	1253	39,25
	35	8,4	0,3648	0,4510	99,42	13,00	44,22	9,02	1250	41,68
	50	8,4	0,3373	0,4108	98,37	12,66	46,02	8,51	1252	41,57
	70	8,5	0,5113	0,5987	98,76	12,47	47,24	8,22	1264	42,28
	100	8,5	0,4802	0,5661	98,40	12,40	45,65	8,29	1280	42,49
	0 (Controlo)	8,5	0,1560	0,1578	100	14,09	52,42	9,37	1249	39,16
	50	9,4	0,4068	0,5834	99,22	13,66	45,99	9,52	1265	41,98
	100	9,4	0,4996	0,7115	98,63	13,20	45,14	9,13	1240	42,08
	0 (Controlo)	9,4	0,2435	0,3472	98,41	14,24	55,42	9,25	1264	40,37
75	50	8,4	0,5230	0,6250	98,68	13,38	45,89	9,26	1253	42,15
	0 (Controlo)	8,6	0,2171	0,2417	98,73	14,41	55,80	9,38	1256	39,76
85	50	8,5	0,4483	0,5312	99,46	13,27	44,36	9,28	1251	42,15
	0 (Controlo)	8,6	0,2470	0,2783	99,73	14,27	54,26	9,39	1243	40,11

III.3. Tratamento Enzimático preliminar na Pasta P2 Lavada e Não Lavada

Tabela XI – Tratamento enzimático preliminar na Pasta P2 (lavada e não lavada) e respetivos resultados obtidos.

Pasta P2	Carga Enzimática (g/tAD)	pH	Abs 280 nm	Abs 457 nm	Rendimento (%)	IK	HexA (mmol/kg)	IK corrigido	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)
Lavada	50	8,9	0,2797	0,3618	96,40	12,19	44,13	8,22	1161	41,47
	100	8,8	0,3564	0,5067	96,35	11,66	42,16	7,86	1180	41,65
	0 (Controlo)	8,9	0,1054	0,1174	98,01	13,13	45,70	9,01	1161	39,36
Não lavada	50	8,7	N.A.	N.A.	99,13	12,31	42,84	8,45	1183	40,30
	100	9,0	N.A.	N.A.	99,26	11,93	43,69	8,00	1149	41,06
	0 (Controlo)	8,9	N.A.	N.A.	100	13,39	45,79	9,27	1142	38,39

III.4. Curvas de Branqueamento (Sequência DE)

Tabela XII – Condições utilizadas nas curvas de branqueamento na Pasta P1 e respetivos valores obtidos.

Carga ClO_2 (%Cl_2 ativo)	Carga H_2O_2 (%)	Carga NaOH (%)	IK	HexA (mmol/kg)	IK corrigido	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	PC number
2,5	0,3	1,3	5,61	-	-	1085	71,28	1,83
2,9			5,27	-	-	1098	72,33	1,85
3,3			4,93	-	-	1111	73,76	1,78
3,7			4,82	-	-	1103	74,08	1,79
2,9	0,45	1,5	4,77	-	-	1079	74,79	1,61
3,3			4,17	17,18	2,62	1068	75,93	1,59
3,7			3,76	15,83	2,34	1089	77,74	1,37
4,1			3,12	-	-	1085	79,00	1,20
3,7	0,45	1,7	3,86	-	-	1068	78,16	1,53
4,1			3,28	-	-	1064	79,74	1,59

III.5. Sequência XDE

Tabela XIII – IK, IK corrigido, HexA e Viscosidade obtidos para as sequências XDE aplicada nas Pastas P1 e P2 lavada e respetivos controlos.

Pasta	Carga Enzimática (g/tAD)	Carga ClO_2*/ NaOH/ H_2O_2 (%)	IK	IK médio	HexA (mmol/kg)	HexA médio (mmol/kg)	IK corrigido	IK corrigido médio	Viscosidade (mL/g)	Viscosidade média (mL/g)
P1	0 (Controlo 1)	3,3/1,5/0,45	4,07 3,69	3,88±0,27	20,26 15,58	17,92±3,31	2,24 2,29	2,26±0,03	1067 1094	1081±19
	0 (Controlo 2)	3,7/1,5/0,45	3,44 3,34	3,39±0,07	19,22 14,90	17,06±3,06	1,71 2,00	1,85±0,21	1094 1088	1091±4
	0 (Controlo 3)	4,1/1,5/0,45	2,50 2,51	2,50±0,00	9,15 9,05	9,10±0,07	1,68 1,69	1,68±0,01	1079 1077	1078±1
	50	3,3/1,5/0,45	3,58 3,00	3,29±0,41	17,40 15,85	16,63±1,09	2,01 1,57	1,79±0,31	1088 1107	1097±13
P2 lavada	0 (Controlo 1)	3,3/1,5/0,45	2,97 2,72	2,85±0,18	16,04 14,41	15,22±1,15	1,53 1,42	1,48±0,07	1045 1008	1026±26
	0 (Controlo 2)	3,7/1,5/0,45	2,59 2,37	2,48±0,16	12,99 10,83	11,91±1,53	1,42 1,39	1,40±0,02	1050 1017	1033±24
	0 (Controlo 3)	4,1/1,5/0,45	2,20 2,37	2,28±0,12	8,14 8,05	8,09±0,06	1,46 1,64	1,55±0,13	1011 1018	1015±5
	50	3,3/1,5/0,45	2,07 2,22	2,14±0,11	9,20 9,60	9,40±0,28	1,24 1,36	1,30±0,08	1057 1006	1031±36
	50	3,7/1,35/0,36	2,09 2,19	2,14±0,07	8,80 9,07	8,94±0,19	1,29 1,37	1,33±0,06	1042 1034	1038±6
	100	3,3/1,5/0,45	2,37 2,05	2,21±0,23	12,41 8,57	10,49±2,72	1,25 1,27	1,26±0,02	1091 1030	1060±43

* % de Cl_2 ativo

Tabela XIV – IK, IK corrigido, HexA e Viscosidade obtidos para as sequências XDE aplicadas na Pasta P2 não lavada e respetivos controlos.

Pasta	Carga Enzimática (g/tAD)	Carga ClO_2*/ NaOH/ H_2O_2 (%)	IK	IK médio	HexA (mmol/kg)	HexA médio (mmol/kg)	IK corrigido	IK corrigido médio	Viscosidade (mL/g)	Viscosidade média (mL/g)
P2 não lavada	0 (Controlo 1)	3,3/1,5/0,45	3,01 3,22	3,11±0,15	16,63 15,09	15,86±1,09	1,51 1,86	1,68±0,25	1008 1028	1018±14
	0 (Controlo 2)	3,7/1,5/0,45	2,92 2,77	2,85±0,11	16,00 13,39	14,69±1,85	1,48 1,57	1,52±0,06	973 996	984±16
	0 (Controlo 3)	4,1/1,5/0,45	2,48 2,48	2,48±0,00	7,47 7,14	7,31±0,24	1,80 1,83	1,82±0,02	1012 1041	1026±21
	50	3,3/1,5/0,45	2,51 2,40	2,45±0,08	12,70 11,68	12,19±0,72	1,37 1,34	1,36±0,02	990 1058	1024±48
	50	3,7/1,35/0,36	2,56 2,52	2,54±0,03	10,73 9,78	10,26±0,67	1,59 1,63	1,61±0,03	1025 1013	1019±8
	100	3,3/1,5/0,45	2,45 2,30	2,38±0,11	14,13 11,21	12,67±2,06	1,18 1,29	1,23±0,08	1024 1040	1032±11

* % de Cl_2 ativo

Tabela XV – Brancura ISO, PC number e Rendimento obtidos para as sequências XDE aplicadas nas Pastas P1 e P2 lavada e respetivos controlos.

Pasta	Carga Enzimática (g/tAD)	Carga ClO_2*/ NaOH/ H_2O_2 (%)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO média (%)	PC number	PC number médio	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)
P1	0 (Controlo 1)	3,3/1,5/0,45	77,11 77,85	77,48±0,52	1,48 1,33	1,41±0,11	97,91 97,74	97,83±0,12
	0 (Controlo 2)	3,7/1,5/0,45	78,72 78,33	78,78±0,07	1,28 1,30	1,29±0,01	98,31 98,67	98,49±0,26
	0 (Controlo 3)	4,1/1,5/0,45	81,10 80,98	81,04±0,08	1,20 1,12	1,16±0,06	98,44 99,74	99,09±0,92
	50	3,3/1,5/0,45	79,57 81,05	80,31±1,05	1,22 1,24	1,23±0,02	97,10 95,96	96,53±0,80
P2 lavada	0 (Controlo 1)	3,3/1,5/0,45	81,11 81,34	81,23±0,16	1,26 1,21	1,23±0,04	97,74 98,61	98,18±0,62
	0 (Controlo 2)	3,7/1,5/0,45	82,39 82,29	82,34±0,07	1,17 1,14	1,15±0,03	97,34 97,29	97,32±0,04
	0 (Controlo 3)	4,1/1,5/0,45	82,56 82,14	82,35±0,30	1,04 1,06	1,05±0,01	96,94 97,30	97,12±0,25
	50	3,3/1,5/0,45	83,07 82,84	82,96±0,16	0,96 0,86	0,91±0,07	94,93 96,06	95,50±0,79
	50	3,7/1,35/0,36	82,88 82,67	82,78±0,15	0,83 0,94	0,89±0,07	96,33 96,28	96,30±0,03
	100	3,3/1,5/0,45	83,81 83,80	83,81±0,01	0,90 0,81	0,86±0,06	94,04 94,89	94,47±0,60

* % de Cl_2 ativo

Tabela XVI – Brancura ISO, PC number e Rendimento obtidos para as sequências XDE aplicadas na P2 não lavada e respetivos controlos.

Pasta	Carga Enzimática (g/tAD)	Carga ClO_2*/ NaOH/ H_2O_2 (%)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO média (%)	PC number	PC number médio	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)
P2 não lavada	0 (Controlo 1)	3,3/1,5/0,45	79,16 79,04	79,10±0,08	1,13 1,22	1,17±0,06	99,25 98,89	99,07±0,25
	0 (Controlo 2)	3,7/1,5/0,45	80,42 80,13	80,28±0,21	1,12 1,15	1,13±0,02	98,19 98,46	98,33±0,19
	0 (Controlo 3)	4,1/1,5/0,45	80,28 80,70	80,49±0,30	1,16 1,09	1,13±0,05	99,23 97,51	98,37±1,22
	50	3,3/1,5/0,45	81,98 82,00	81,99±0,01	0,90 0,94	0,92±0,03	97,17 95,71	96,44±1,04
	50	3,7/1,35/0,36	81,37 81,00	81,19±0,26	0,95 0,90	0,93±0,04	98,66 99,09	98,88±0,31
	100	3,3/1,5/0,45	82,50 82,03	82,27±0,33	0,92 0,92	0,92±0,00	95,77 96,40	96,09±0,45

* % de Cl_2 ativo

Anexo IV – Segurança na Dissertação

O trabalho desenvolvido foi realizado durante um período de 5 meses no laboratório B15 do Departamento de Engenharia Química. Os laboratórios não são lugares necessariamente perigosos, mas para que nada de inesperado aconteça é necessário tomar certas precauções e medidas de segurança. Várias foram as medidas básicas de segurança adotadas, como por exemplo:

- Uso de bata, de modo a proteger o corpo e a roupa;
- Uso de luvas;
- Manter a bancada de trabalho limpa e arrumada;
- Verificar os rótulos das embalagens dos produtos químicos a utilizar;
- As experiências que possam provocar a libertação de gases ou vapores devem ser realizadas em locais próprios (*hotte*);
- Na diluição de ácidos, adicionar primeiro a água e depois o ácido;
- Não usar cabelo comprido solto.

Para além destas medidas foi efetuada uma pesquisa prévia dos principais riscos e medidas de prevenção a ter em conta na utilização dos diferentes reagentes utilizados. Na Tabela XVII apresenta-se para a maioria dos compostos utilizados no decorrer deste trabalho, os pictogramas de perigo, as frases de risco e frases de prevenção.

Tabela XVII – Principais riscos e cuidados a ter no manuseamento dos compostos utilizados ao longo da dissertação.

Composto	Fórmula Química	Pictogramas de perigo	Frases de Perigo	Frases de prevenção
Acetato de sódio	CH_3COONa	Esta substância não está classificada como perigosa de acordo com a legislação da União Europeia.		- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Após inalação: exposição ao ar fresco; - Em caso de contacto com os olhos: enxaguar abundantemente com água. Retirar as lentes de contacto; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Após ingestão: beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico se se sentir mal.
Ácido 3,5 - Dinitrosalicílico	$C_7H_4N_2O_7$		- Nocivo por ingestão.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Lavar a pele cuidadosamente após manuseamento; - Em caso de ingestão, se sentir indisposição, contacte um centro de informação antivenenos ou um médico. Enxaguar a boca; - Se entrar em contacto com os olhos: lavar os olhos com água como precaução; - Em caso de inalação: se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico; -Em caso de contacto com a pele: lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	 	- Líquido e vapor inflamáveis; - Pode ser corrosivo para os metais; Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Manter afastado do calor; - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vómito; - Em caso de contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante alguns minutos. Remover lentes de contacto, se existirem e forem fáceis de remover. Continuar a enxaguar; - Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um Centro de Informação Antivenenos ou um médico; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche.
Ácido bórico	H_3BO_3		- Pode prejudicar a fertilidade. Pode prejudicar o feto.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Obter instruções específicas antes da utilização; - Após inalação: exposição ao ar fresco; - Em caso de contacto com os olhos: enxague cuidadosamente com água durante vários minutos. No caso de uso de lentes de contacto, remova-as, se for fácil. Continue enxaguando; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Após ingestão: beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico se se sentir mal.

Tabela XVII – Principais riscos e cuidados a ter no manuseamento dos compostos utilizados ao longo da dissertação. (continuação)

Composto	Fórmula Química	Pictogramas de perigo	Frases de Perigo	Frases de prevenção
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$		- Provoca irritação ocular grave.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Após inalação: exposição ao ar fresco; - Em caso de contacto com os olhos: enxague cuidadosamente com água durante vários minutos. No caso de uso de lentes de contacto, remova-as, se for fácil. Continue enxaguando; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Após ingestão: beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico se se sentir mal.
Ácido clorídrico	HCl	 	- Pode ser corrosivo para os metais; - Provoca irritação cutânea; - Provoca irritação ocular grave; - Pode provocar irritação das vias respiratórias.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Se entrar em contacto com a pele, lavar abundantemente com sabonete e água; - Se entrar em contacto com os olhos, enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar; - Após inalação: exposição ao ar fresco. Em caso de paragem respiratória chamar imediatamente um médico; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Se ingerido: beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico.
Ácido ortofosfórico	H_3PO_4		- Pode ser corrosivo para os metais; - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves;	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vómito; - Em caso de contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante alguns minutos. Remover lentes de contacto, se existirem e forem fáceis de remover. Continuar a enxaguar; - Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um Centro de Informação Antivenenos ou um médico; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche.

Tabela XVII – Principais riscos e cuidados a ter no manuseamento dos compostos utilizados ao longo da dissertação. (continuação)

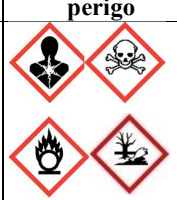
Composto	Fórmula Química	Pictogramas de perigo	Frases de Perigo	Frases de prevenção
Ácido sulfúrico	H_2SO_4		- Causa queimaduras severas à pele e danos graves aos olhos; - Tóxico se ingerido; - Quando inalado pode causar sintomas alérgicos, asma ou dificuldades de respiração.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vómito; - Em caso de contacto com a pele ou olhos, lavar imediatamente a região com água em abundância por no mínimo 15 minutos; - Armazenar e manusear em ambiente ventilado, evitando a concentração de vapores.
Cloreto de bário	$BaCl_2$		- Tóxico por ingestão; - Nocivo por inalação.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Em caso de exposição ou suspeita de exposição contactar um centro de informação antivenenos ou um médico; - Após inalação: exposição ao ar fresco. Em caso de paragem respiratória chamar imediatamente um médico; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Após contacto com os olhos: enxaguar abundantemente com água. Retirar as lentes de contacto; - Se ingerido: beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico.
Cloreto de mercúrio	$HgCl_2$		- Mortal por ingestão; - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves; - Suspeito de provocar anomalias genéticas; Suspeito de afetar a fertilidade; - Afeta os órgãos (rins) após exposição prolongada ou repetida.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vómito; - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as; - Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um Centro de Informação Antivenenos ou um médico.
Cuprietilenodiamina (CED)	$C_2H_8N_2/Cu$		- Pode provocar queimaduras na pele e lesões oculares; - Nocivo por ingestão.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vómito; - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as; - Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um Centro de Informação Antivenenos ou um médico.

Tabela XVII – Principais riscos e cuidados a ter no manuseamento dos compostos utilizados ao longo da dissertação. (continuação)

Composto	Fórmula Química	Pictogramas de perigo	Frases de Perigo	Frases de prevenção
Dióxido de Cloro	ClO_2		- Causa irritação, podendo causar queimaduras nos olhos; - Pode causar irritação e queimaduras nos olhos; - Pode causar irritação nas mucosas situadas no aparelho respiratório; - Nocivo por ingestão: pode causar danos aos dentes, hemorragias nas mucosas da boca, tubo digestivo e estômago.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Manusear em ambiente ventilado, evitando a concentração de vapores; - Em caso de inalação: Remover a vítima para ambiente arejado. Lavar o nariz e a boca com bastante água. Administrar Oxigênio em caso de exposição intensa ao produto. Procurar atendimento médico; - Em caso de contacto com a pele: lavar com água em abundância, inclusive roupas e materiais contaminados; - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as; - Em caso de ingestão: Beber água, não induzir ao vómito. Caso a pessoa esteja inconsciente, não dê nada para beber. Procurar um médico.
Fenol	C_6H_5OH		- Tóxico por ingestão, contacto com a pele ou inalação; - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves; - Suspeito de provocar anomalias genéticas; - Pode afectar os órgãos (sistema nervoso central, rins, fígado, pele) após exposição prolongada ou repetida.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vómito; - Se entrar em contacto com a pele: lavar abundantemente com sabonete e água; - Em caso de inalação: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração; - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar; - Em caso de exposição ou suspeita de exposição: contacte imediatamente um centro de informação antivenenos ou um médico.
Hidróxido de Sódio	NaOH		- Pode ser corrosivo para os metais; - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.	- Usar luvas de proteção e proteção ocular; - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vómito; - Em caso de contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante alguns minutos. Remover lentes de contacto, se existirem e forem fáceis de remover. Continuar a enxaguar; - Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um Centro de Informação Antivenenos ou um médico.

Tabela XVII – Principais riscos e cuidados a ter no manuseamento dos compostos utilizados ao longo da dissertação. (continuação)

Composto	Fórmula Química	Pictogramas de perigo	Frases de Perigo	Frases de prevenção
Iodeto de Potássio	KI		- Afeta os órgãos (tiróide) após exposição prolongada ou repetida por ingestão.	- Usar luvas e vestuário de proteção e usar proteção ocular e facial; - Em caso de indisposição, consulte um médico; - Depois de inalar: exposição ao ar fresco. Chamar um médico; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Após contacto com os olhos: Enxaguar abundantemente com água. Retirar as lentes de contacto; - Após ingestão: beber imediatamente água (dois copos no máximo). Consultar um médico.
Permanganato de Potássio	$KMnO_4$		- Pode agravar incêndios; comburente; - Nocivo por ingestão; - Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.	- Manter ou guardar afastado de materiais combustíveis; - Evitar a libertação para o ambiente; - Usar luvas de proteção e proteção ocular; - Em caso de inalação: inalar ar fresco. Em caso de respiração irregular ou paragem respiratória procurar imediatamente assistência médica; - Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com água. Retirar toda a roupa contaminada. Em caso de irritações cutâneas, consultar um dermatologista; - Em caso de contacto com os olhos: enxaguar imediatamente, cuidadosa e abundantemente com água; - Em caso de ingestão: enxaguar imediatamente a boca com muita água.
Peróxido de Hidrogénio	H_2O_2		- Pode causar fogo ou explosão. Forte oxidante; - Perigoso em caso de ingestão ou inalação; - Pode causar irritação e/ou queimaduras na pele; - Pode causar lesões oculares graves.	- Usar luvas e vestuário de proteção; - Usar proteção ocular e facial; - Em caso de inalação: Remover a vítima para um locado arejado; - Em caso de contacto com a pele: Retirar cuidadosamente roupas e calçados contaminados. Lave o local atingido com água corrente em abundância por 15 minutos, no mínimo; - Em caso de contacto com os olhos: Levante as pálpebras e lave imediata e continuamente com grande quantidade de água por 15 minutos. Em seguida, encaminhe para o atendimento médico; - Em caso de ingestão: não induzir o vómito. Dar água aos poucos para beber e nunca administrar nada se a pessoa estiver inconsciente. Encaminhar para o médico imediatamente.

Tabela XVII – Principais riscos e cuidados a ter no manuseamento dos compostos utilizados ao longo da dissertação. (continuação)

Composto	Fórmula Química	Pictogramas de perigo	Frases de Perigo	Frases de prevenção
Sulfito de sódio	Na_2SO_3	Esta substância não está classificada como perigosa de acordo com a legislação da União Europeia.		- Usar proteção ocular e facial; - Usar luvas e vestuário de proteção; - Após inalação: exposição ao ar fresco; - Em caso de contacto com os olhos: enxaguar abundantemente com água. Retirar as lentes de contacto; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Após ingestão: beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico se se sentir mal.
Tiossulfato de sódio	$Na_2S_2O_3$	Esta substância não está classificada como perigosa de acordo com a legislação da União Europeia.		- Usar luvas e vestuário de proteção; - Usar proteção ocular e facial; - Após inalação: exposição ao ar fresco; - Em caso de contacto com os olhos: enxaguar abundantemente com água. Retirar as lentes de contacto; - Em caso de contacto com a pele: retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche; - Após ingestão: beber água (dois copos no máximo). Consultar um médico se se sentir mal.

Legenda:

Perigo

Oxidante

Corrosivo

Cuidado

Tóxico

Poluente