



Tânia Cristina Santos Sintra

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas *kraft* pré-deslenhificadas com oxigénio

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

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tânia Cristina Santos Sintra

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas *kraft* pré-deslenhificadas com oxigénio

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra com vista à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores

Professora Doutora Maria de Graça V.S. Carvalho

Engenheiro José Luís S.C. Amaral

Com a colaboração do Doutor Pedro E.G. Loureiro

Instituições

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

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

Financiamento

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

Novozymes A/S, Dinamarca

Coimbra, 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Tudo é considerado impossível, até acontecer.”

Nelson Mandela

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

Agradecimentos

O trabalho que aqui se apresenta só foi possível graças à colaboração e apoio de algumas pessoas e entidades, às quais não posso deixar de prestar o meu reconhecimento.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Graça Carvalho, por todo o apoio e incentivo demonstrados, pelo tempo que generosamente dedicou e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Mestre Ana Moura, pelo apoio e disponibilidade demonstrado todos os dias no laboratório, pela ajuda prestada na resolução dos mais diversos problemas que surgiram no decorrer deste estudo e pelo bom ambiente de trabalho, muito obrigada.

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

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

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

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio incondicional, incentivo, força, carinho e paciência demonstrados, por acreditarem nas minhas capacidades, obrigada por tudo. Sem eles nada disto seria possível.

Ao Micael, por tudo o que representa na minha vida, por todo o apoio, carinho, força, incentivo e paciência demonstrados. O meu mais sincero obrigado.

À Cristina Jordão, pela amizade incondicional desde sempre, por tudo o que representa para mim, muito obrigada.

À Tânia Marques, por todo o apoio e amizade com que sempre me brindou. Obrigada por todos os momentos que partilhamos. Coimbra, sem ti não teria o mesmo encanto.

À Cátia Gaspar, à Carolina Pinheiro, à Dina Domingues e à Inês Leal, obrigada por todos os momentos que passamos juntas e por toda a amizade demonstrada ao longo destes anos.

*A todos que de alguma forma me ajudaram a concretizar este objetivo, o meu mais sincero
obrigada!*

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Resumo

O presente estudo teve como principais objetivos analisar o desempenho de uma xilanase, a xilanase X, no tratamento enzimático de pastas *kraft* de *E. globulus* pré-deslenhificadas com oxigénio (pasta O), recolhidas numa unidade industrial portuguesa, e avaliar a poupança de reagentes químicos usados no branqueamento (dióxido de cloro – ClO₂), o ganho de brancura e a estabilidade da brancura.

Para tal, foram realizados vários ensaios com a xilanase X em diferentes condições de operação (pH 8; 9; 9,5 e 10) e dose enzimática (0,067; 0,134 e 0,2 kg/t odp). A temperatura e o tempo do estágio enzimático mantiveram-se constantes e foram de 88°C e 60 min, respetivamente. Para todas as condições testadas foi realizado pelo menos um ensaio de controlo, ou seja, ensaio realizado nas mesmas condições do tratamento enzimático mas sem adição de enzima.

Na pasta O foram aplicados estágios X (tratamento enzimático), D (dióxido de cloro) e E (extração alcalina) obtendo-se, desta forma, as seguintes sequências de branqueamento: OXDE e ODE. As pastas OXDE e ODE foram comparadas de modo a avaliar a influência do tratamento enzimático na poupança de dióxido de cloro nos estágios posteriores, bem como na brancura e sua estabilidade.

Os filtrados resultantes do tratamento enzimático (sequência de branqueamento OX) foram analisados por espectroscopia UV, a 205 nm, e por HPLC de modo a ter perceção da remoção da lenhina residual e de monossacarídeos. O índice kappa, a viscosidade, a brancura ISO, a reversão de brancura, o teor de lenhina solúvel e insolúvel (Klason), de ácidos hexenurónicos, e de pentosanas também foram determinados nas pastas obtidas.

Através da análise dos resultados, foi possível concluir que a xilanase X desempenha melhor as suas funções a pH 8, sendo possível obter 29 pontos no ganho de brancura ISO com a carga de enzima mais baixa (0,067 kg/t odp). Com o *PC number* foi possível obter uma diminuição de 0,4 pontos para a maior carga de enzima (0,2 kg/t odp) e pH 8, o que indica que nestas condições a pasta apresenta uma maior estabilidade de brancura ISO.

Com o tratamento enzimático, ocorreu alguma diminuição no índice kappa, tornando-se este efeito tanto maior quanto maior for a atividade da enzima. Foi possível confirmar, através da análise por HPLC, que a xilanase atua através da hidrólise das xilanas presentes na

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

pasta libertando xilose, galactose e alguns xilo-oligossacarídeos, o que contribui para uma perda de rendimento. Quanto mais elevado for o pH utilizado no ensaio, menor é a perda de rendimento associada, variando entre ~0% para pH 10 e 3% para pH 8, sendo possível obter uma poupança de dióxido de cloro de 15 a 60% para esta gama de pH.

As condições de tratamento enzimático a pH 9 são aquelas que permitem um melhor balanço entre os efeitos positivos e negativos da ação da xilanase X: poupança de ClO₂ de ~20%, ganho de brancura ISO de ~28%, com perda de rendimento de ~1%, para uma carga enzimática de 0,067 kg/t odp.

Palavras-chave: Branqueamento, tratamento enzimático, xilanase, dióxido de cloro, sequência OXDE

Abstract

The aim of this study was to evaluate the performance of a xylanase, xylanase X, in the enzymatic treatment of an oxygen pre-delignified *E. globulus* kraft pulp (pulp O), collected in a Portuguese mill. Possible savings in bleaching reagents (chlorine dioxide – ClO₂), the brightness gain and brightness stability were also studied.

Different operating conditions were studied: pH (8, 9, 9.5 and 10) and enzyme dosage (0.067, 0.134 and 0.2 kg/t odp). The temperature and the retention time were kept constant (88°C and 60 min, respectively). For all tested conditions at least one control test was performed, (at the same conditions but without the addition of enzyme).

Different bleaching stages were applied in pulp O: X (enzymatic treatment), D (chlorine dioxide) and E (alkaline extraction) resulting in OXDE and ODE bleaching sequences. OXDE and ODE pulps were compared, in order to evaluate the effect of the enzymatic treatment on chlorine dioxide savings in the following stages, as well as, the brightness and brightness stability.

Filtrates from the enzymatic treatment (OX bleaching sequence) were analyzed by UV spectrometry at 205 nm and by HPLC in order to perceive the removal of residual lignin and monosaccharides. The obtained pulps were analyzed regarding the determination of kappa number, viscosity, ISO brightness, PC number, soluble and insoluble lignin (Klason lignin), hexenuronic acids, pentosans and the characterization of carbohydrates.

By analyzing the results, it was possible to concluded that the optimal pH for xylanase X is 8. At pH 8 is possible to obtain a brightness gain of 29 points ISO with the lowest enzyme dosage (0.067 kg/t odp) and a decrease in PC number of 0.4 points for the highest enzyme dosage (0.2kg/t odp), at pH 8, indicating that under these conditions the pulp has a higher ISO brightness stability.

With the enzymatic treatment there was a decrease in the kappa number and this effect increases with the increase of enzyme activity. It was verified by HPLC analysis that the xylanase acts by hydrolyzing the xylans present in the pulp, releasing xylose, galactose and some xylo-oligosaccharides, which contribute for yield loss.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

The higher the pH used in the assay, the lower the loss associated with yield, ranging from ~0% at pH 10 to 3% at pH 8, being possible to obtain a chlorine dioxide savings from 15 to 60% for this pH range.

The enzyme treatment conditions at pH 9 are those that allow a better balance between the positive and negative effects of the xylanase X action: ClO₂ savings of ~20%, ISO brightness gain of ~28%, yield loss of ~1% for an enzyme load of 0.067 kg/t odp.

Keywords: Bleaching, enzyme treatment, xylanase, chlorine dioxide, OXDE sequence.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
NOMENCLATURA.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Âmbito e Motivação	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Organização da dissertação.....	3
2. PRODUÇÃO DE PASTAS <i>KRAFT</i>	5
2.1. Química da madeira	5
2.1.1. Celulose	6
2.1.2. Hemiceluloses.....	7
2.1.3. Lenhina	9
2.2. Etapas do processo de cozimento <i>kraft</i>	11
2.3. Reações indesejáveis dos polissacarídeos.....	13
2.3.1. Formação de ácidos hexenurónicos.....	15
2.3.2. Readsorção das hemiceluloses na superfície das fibras.....	16
2.4. Reações com a lenhina.....	16
2.5. Origem dos Compostos Cromóforos	17
3. BRANQUEAMENTO.....	20
3.1. Tratamento Enzimático.....	21
3.2. Dióxido de Cloro	26
3.3. Extração alcalina.....	30
3.4. Reversão da brancura.....	31
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	33
4.1. Matéria-prima	33
4.2. Estágios de Branqueamento.....	34
4.2.1. Tratamento enzimático	35

4.2.2.	Sequência OD ₀ EP e OXD ₀ EP	36
4.3.	Caracterização das pastas	36
4.3.1.	Brancura ISO.....	36
4.3.2.	Reversão da brancura	37
4.3.3.	Índice kappa	37
4.3.4.	Determinação da lenhina.....	38
4.3.5.	Ácidos hexenurónicos	38
4.3.6.	Determinação do teor de pentosanas.....	38
4.3.7.	Viscosidade	39
4.3.8.	Determinação do Rendimento.....	39
4.4.	Caracterização dos filtrados	40
5.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	42
5.1.	Caraterização das pastas utilizadas nos ensaios	42
5.2.	Sequência ODE	42
5.3.	Sequência OXDE	45
5.3.1.	Ganho de brancura	49
5.4.	Poupança de reagentes.....	50
5.5.	Rendimentos.....	52
5.6.	Caracterização das Pastas	53
5.6.1.	Determinação da Lenhina	53
5.6.2.	Determinação dos ácidos hexenurónicos	54
5.6.3.	Teor de Pentosanas.....	55
5.7.	Caracterização dos filtrados	56
5.7.1.	Análise dos Filtrados por Espectroscopia UV	56
5.7.2.	Açúcares redutores pelo método DNS	57
5.7.3.	Açúcares por HPLC	61
6.	CONCLUSÕES	63
6.1.	Perspetivas de trabalho futuro	64
	BIBLIOGRAFIA	65
	ANEXOS	71

ANEXO I. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	72
I.1. Preparação dos Ensaios	72
I.1.1. Determinação do Teor de Secura e Massa de Pasta Húmida	72
I.1.2. Cálculo da quantidade de Reagentes	73
I.1.3. Preparação da Solução Tampão	74
I.1.4. Determinação da Concentração de Dióxido de Cloro Concentrado	75
I.1.5. Preparação e aferição da solução de NaOH	78
I.1.6. Determinação da Concentração de Peroxido de Hidrogénio Concentrado	80
I.2. Metodologia Experimental de Branqueamento	83
I.3. Filtrados residuais	85
I.2.1. Determinação da Concentração de Dióxido de Cloro Residual	85
I.2.2. Determinação da Concentração de NaOH residual	85
I.2.3. Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogénio Residual	87
I.4. Caracterização das Pastas	90
I.4.1. Determinação do Índice Kappa (IK)	90
I.4.2. Determinação da Viscosidade Intrínseca	94
I.4.3. Preparação de Folhas para Medição da Brancura ISO	98
I.4.4. Determinação de Ácidos Hexenurónicos	100
I.4.5. Determinação da Lenhina	101
I.4.6. Caracterização de Hidratos de Carbono – Método LAP – 006 adaptado (ponto 8.5 - método para a determinação da atividade das celulases)	103
I.4.7. Caracterização de Hidratos de Carbono via HPLC	108
I.4.8. Determinação do Teor de Pentosanas – TAPPI T 223)	109
ANEXO II. CONDIÇÕES E RESULTADOS EXPERIMENTAIS	113
II.1. Sequência ODE	113
II.2. Sequência OXDE	114
II.3. Rendimentos	116
II.4. Espectrometria UV	116
II.5. Ácidos Hexenurónicos	118
II.6. Lenhina Solúvel e Lenhina Klason	119

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

II.7. Caracterização dos Hidratos de Carbono	120
II.7.1. DNS	120
II.7.2. HPLC	123
II.8. Teor de Pentosanas	125
II.9. Poupança de reagentes.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura da celulose, (adaptado de Sjostrom, 1981).....	7
Figura 2.2. Estrutura de glucomananas de folhosas (adaptada de Laine, 2005)	8
Figura 2.3. Estrutura da O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilana (adaptada de Carvalho, 1999).....	9
Figura 2.4. Fórmula molecular resumida da glucuronoxilanas de <i>E. globulus</i> , (adaptada de Evtuguin et al., 2003).	9
Figura 2.5. Representação dos diferentes tipos de lenhina (adaptado de Carvalho, 1999).	10
Figura 2.6. Esquema representativo das fases da deslenhificação e principais reações dos principais componentes da madeira (adaptado de Sixta et al., 2006).....	13
Figura 2.7. Representação da formação de ácido hexenurónico em meio alcalino a partir de ácido 4-O-metilglucurónico (adaptado de Pinto, 2005).	15
Figura 2.8. Representação das ligações éter e ligações carbono-carbono que ocorrem na lenhina. Em que a) é a ligação α -O-4; b) é a ligação β -O-4; c) é a ligação β -5'; d) é a ligação β -1' e e) é a ligação β - β (adaptada de Esteves, 2013).	17
Figura 2.9. Representação de alguns cromóforos (adaptado de Dyer, 2004).....	18
Figura 2.10. Formação de cromóforos a partir de subestruturas de lenhina fenólica (adaptado de Sixta et al., 2006).....	19
Figura 3.1. Estrutura da molécula de xilana e ação das principais xilanases (adaptado de Gomes et al., 2006).....	24
Figura 3.2. Principais produtos formados na reação do dióxido de cloro e os ácidos hexenurónicos. Em que a) é o ácido tetrárico, b) é o ácido pentárico, c) é o ácido 2-cloro-2-deoxipentárico e d) é o ácido 3-deoxi-3,3-dicloro-2-oxoexárico.	27
Figura 3.3. Estruturas de ressonância do dióxido de cloro (adaptado de Suess, 2010).....	27

Figura 3.4. Reação de oxidação de estruturas de lenhina fenólicas com dióxido de cloro (adaptado de Suess, 2010).	28
Figura 4.1. Representação típica da zona de tratamento de pasta após o cozimento, numa fábrica com pré-deslenhificação com oxigénio, em que T1 e T2 são as torres de armazenamento de pasta a alta consistência antes e após o estágio O (adaptado de Pinheiro, 2014).....	33
Figura 4.2. Metodologia experimental.....	34
Figura 5.1. Evolução da brancura ISO das pastas ODE e respetiva reversão de brancura com a variação da carga de dióxido de cloro (expressa como cloro ativo).....	43
Figura 5.2. Evolução do índice kappa com a carga de dióxido de cloro aplicada (expressa como cloro ativo).....	44
Figura 5.3 Evolução da viscosidade com a carga de dióxido de cloro aplicada (expressa como cloro ativo).....	44
Figura 5.4. Ganho de brancura obtido através do tratamento enzimático aplicado à pasta P1.	49
Figura 5.5. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO_2 , a pH 8.....	50
Figura 5.6. Representação da absorvância do filtrado, medida a 205 nm para as diferentes cargas de enzima.....	57
Figura 5.7. Esquema experimental aplicado nalguns ensaios para avaliar a libertação de açúcares produzida pela Xilanase X na sua acção sobre as pastas O.	59
Figura 0.1. Inclinação do Erlenmeyer para sedimentação da lenhina insolúvel (adaptado de Tappi T 222).	103
Figura 0.2. Curva de calibração 1.	106
Figura 0.3. Curva de calibração 2.	107
Figura 0.4. Curva de calibração 3.	108
Figura 0.5. Montagem experimental.....	111

Figura 0.6. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO_2 , a pH 9.....	127
Figura 0.7. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO_2 , a pH 9,5.....	128
Figura 0.8. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO_2 , a pH 10.....	128

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2-1. Composição química genérica da madeira (em base seca) de resinosas, folhosas e <i>Eucalyptus globulus</i> nacional. (adaptado de Carvalho, 1999;Fengel et al, 1989; Sjostrom, 1981).	6
Tabela 3-1. Principais agentes de branqueamento e reatividade para com a lenhina e polissacarídeos (adaptada de Bajpai, 2012; Sixta et al., 2006; Suess, 2010).	21
Tabela 3-2. Classificação e aplicação de enzimas em diversos processos na indústria papelreira (adaptado de Novozymes A/S, 2010; Pinheiro, 2014; Skals et al., 2008).....	22
Tabela 4-1. Condições de operação para a sequência de branqueamento OXD ₀ EP.	35
Tabela 5-1. Caracterização das pastas utilizadas nos ensaios.	42
Tabela 5-2. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 10*.....	46
Tabela 5-3. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 9,5*.....	47
Tabela 5-4. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 9*.....	47
Tabela 5-5. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 8*.....	48
Tabela 5-6. Poupança de reagente ClO ₂ obtida para todos os ensaios realizados.	51
Tabela 5-7. Rendimento após aplicação de xilanase X na pasta P2.	52
Tabela 5-8. Lenhina de Klason (KL) e lenhina solúvel (ASL) das pastas obtidas antes e após o tratamento enzimático - sequência OX.	53
Tabela 5-9. Ácidos hexenurônicos antes e após aplicação da xilanase.	54
Tabela 5-10. Teor de pentosanas obtido antes e após estágio com xilanase X.	56
Tabela 5-11. Equivalentes de xilose antes e após O tratamento dos filtrados dos estágios X com uma beta-xilosidase (BX).	58
Tabela 5-12. Concentração de xilose presente no filtrado obtido após tratamento enzimático da pasta O: filtrado “tal e qual” e filtrado resultante de novo tratamento do filtrado “tal qual” com xilanase X.....	60

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

Tabela 5-13. Xilose nos filtrados provenientes da aplicação da beta-xilosidase BX em xilana de <i>oat spelts</i> e em xilana de <i>beechwood</i>	60
Tabela 5-14. Xilose nos filtrados provenientes da aplicação da beta-xilosidase BX em amostras líquidas contendo os hidrolisados enzimáticos de xilana de <i>oat spelts</i> e de xilana de <i>beechwood</i>	61
Tabela 5-15. Tempos de retenção correspondentes a cada açúcar.	62
Tabela 5-16. Açúcares detetados por HPLC nos filtrados dos estágios X e nos filtrados sujeitos a uma 2ª hidrólise.	62
Tabela 0-1. Massa necessária de cada composto para preparar 1 L de tampão B-R.	75
Tabela 0-2. Quantidade necessária de parte A e B necessária para preparar o tampão B-R com um determinado pH.	75
Tabela 0-3. Volume de cloreto de bário a utilizar em função do volume de filtrado disponível.	86
Tabela 0-4. Fator d. Equação equivalente: $d=0,89301+0,021456*C$	94
Tabela 0-5. Massa de pasta a pesar, adequada aos valores previstos para a viscosidade da pasta.	97
Tabela 0-6. Produto $c[\eta]$ correspondente a diferentes raios de viscosidade (η raios).....	98
Tabela 0-7. Quantidade necessária de xilose e de volume de tampão, e respectivas absorvâncias para a curva de calibração 1.....	105
Tabela 0-8. Quantidade necessária de xilose e de volume de tampão, e respectivas absorvâncias para a curva de calibração 2.....	106
Tabela 0-9. Quantidade necessária de xilose e de volume de tampão, e respectivas absorvâncias para a curva de calibração 3.....	107
Tabela 0-10. Especificações para a análise das amostras por HPLC.....	109
Tabela 0-11. Quantidade aproximada de matéria-prima a pesar (base OD).....	109

Tabela 0.12. Apresentação da brancura ISO, da reversão da brancura, do <i>PC number</i> e do ganho de brancura.	113
Tabela 0-13. Valores detalhados de viscosidade e IK para as diferentes cargas de cloro ativo.	113
Tabela 0.14. Apresentação das condições e resultados obtidos para as sequências OXDE... 114	
Tabela 0.15. Rendimentos obtidos após tratamento enzimático com xilanase X e sequência XDE.....	116
Tabela 0.16. Apresentação das condições e resultados obtidos nos ensaios realizados de espectroscopia UV.....	117
Tabela 0.17. Resultados experimentais obtidos para os ácidos hexenurônicos, bem como para o IK e lenhina total após determinação dos mesmos.....	118
Tabela 0.18. Resultados obtidos para a lenhina Klason, lenhina solúvel e lenhina total.	119
Tabela 0.19. Concentração de xilose presente no filtrado obtido após tratamento enzimático da pasta (filtrado tal e qual e novo filtrado sujeito a novo tratamento com xilanase X a 88°C e pH 8 durante 2 horas).....	120
Tabela 0.20. Xilose libertada pela BX aquando da utilização de xilana <i>oat spelts</i> e xilana <i>beechwood</i>	121
Tabela 0.21. Xilose libertada pela BX aquando da utilização de xilana <i>oat spelts</i> e xilana <i>beechwood</i> juntamente com duas xilanases distintas, a xilanase X e a xilanase C..	121
Tabela 0.22. Xilose libertada pela BX aquando da utilização de xilana <i>oat spelts</i> e xilana <i>beechwood</i> juntamente com duas xilanases distintas, a xilanase X e a xilanase C, desta vez submetidas a diferentes condições de operação.	122
Tabela 0.23. Açúcares detetados durante a realização do método de HPLC	123
Tabela 0.24. Teor de pentosanas presente na pasta.	125
Tabela 0.25. Apresentação das brancuras ISO, brancuras ISO após reversão, <i>PC number</i> e ganho de brancura.	126

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

NOMENCLATURA

AD – *air dry* (“seca ao ar”)

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

C – Estágio com cloro

CED – Solução de cupri-etilenodiamina

D – Estágio de branqueamento com dióxido de cloro

E – Estágio de extração alcalina

ECF – *Elemental Chlorine Free* (Livre de cloro elementar)

GlcA – Ácido glucurónico

GC – Cromatografia Gasosa

HexA – Ácido hexenurónico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta pressão

ISO – *International Organization for Standardization*

IK – Índice kappa

k – Coeficiente de absorção

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

Me – Grupos metilo

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

P- Estágio de branqueamento com peróxido de hidrogénio

PC number – *Post Color Number*

R_∞- Refletância

s – Coeficiente de dispersão

T – Temperatura (°C)

t – Tempo

TCF – *Totally Chlorine Free*

X – Estágio com enzima

Xylp – xilose

λ – Comprimento de onda (nm)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Âmbito e Motivação

A indústria papelreira é um segmento de extrema importância para o país, a qual, apesar dos tempos difíceis consegue manter-se firme no mercado, sendo Portugal o 3º maior produtor europeu de pasta branqueada de eucalipto BEKP (*Bleached Eucalyptus Kraft Pulp*) e o 2º produtor europeu de papel fino não revestido (UWF) (Celpa, 2013).

A matéria-prima de eleição em Portugal é a madeira do *Eucalyptus globulus*, considerada por especialistas mundiais como a árvore que alberga a fibra ideal para a produção de papéis de impressão e escrita (UWF). Esta espécie encontra-se em 34,5% do território nacional (Celpa, 2013). É constituída por fibras curtas que se caracterizam por uma excelente rigidez, formando folhas de grande suavidade, elevado índice de mão, grande estabilidade dimensional e fortes resistências em húmido (Portucel Soporcel).

A produção de papel envolve várias etapas processuais, sendo o branqueamento da pasta uma das mais dispendiosas e com maior grau de complexidade, e cujo seu principal objetivo é aumentar a brancura da pasta. Esta etapa deve promover a remoção da lenhina residual que ainda se encontra nas fibras após a etapa de cozimento, sem degradação dos polissacarídeos, e aumentar a estabilidade da brancura através da eliminação dos compostos cromóforos e/ou potencialmente cromóforos. O branqueamento é um processo que envolve vários estágios e diferentes reagentes químicos, mais seletivos do que os usados na etapa anterior (cozimento) (Suess, 2010).

O branqueamento passou por um desenvolvimento significativo nos últimos dois séculos. O primeiro consistiu em aplicar apenas um produto químico para branqueamento de pastas, o hipoclorito. Seguindo-se a utilização de diferentes produtos químicos em larga escala, surgindo assim os processos multi-estágios. A preocupação com o seu impacto sobre o meio ambiente levou à criação de dois tipos de processos: o branqueamento ECF (*Elemental Chlorine Free*), que é livre de cloro elementar, e o branqueamento TCF (*Totally Chlorine Free*) que é totalmente livre de cloro. O branqueamento ECF tem sido o mais utilizado nos últimos anos. Este tem como principal reagente o dióxido de cloro, que é caracterizado por uma elevada seletividade para a oxidação de estruturas cromóforas, sendo por isso um excelente agente de branqueamento e de deslenhificação (Suess, 2010).

O desenvolvimento do processo de branqueamento encontra-se atualmente num estado de maturidade, não havendo renovação prevista nos reagentes de branqueamento. Contudo, a utilização de tratamentos enzimáticos, no pré-branqueamento, nomeadamente com xilanases, tem sido bastante estudada com o objetivo de diminuir a utilização de dióxido de cloro no primeiro estágio de branqueamento, gerando-se menores quantidades de compostos organoclorados nos efluentes e, conseqüentemente, reduzindo o impacto ambiental (Ko et al., 2009; Suess, 2010). Por sua vez, a utilização da xilanases como pós-branqueamento promove uma maior estabilidade da brancura.

De facto, tem sido comprovado que com a utilização de xilanases num pré-branqueamento em pastas de folhosas, é possível obter poupanças de dióxido de cloro cerca de 20 a 25%, enquanto que em pastas de resinosas é possível poupar cerca de 15% (Shatalov et al., 2006; Tolan et al., 1997). No entanto, as condições de pH e temperatura em que geralmente se encontram as pastas industriais (pH 8,5 a 10,5 e 60 a 90 °C) não são compatíveis com as condições óptimas de atividade enzimática (segundo Bajpai, 1999, essas condições são: temperatura entre 35 e 60°C e uma gama de pH entre 6 e 9, caso a xilanase seja de origem bacteriana ou entre 4 e 6, caso a xilanase seja de origem fúngica). Num trabalho recente (Pinheiro, 2014), os estudos preliminares com uma nova enzima desenvolvida pela empresa Novozymes A/S (doravante designada por xilanase X) mostraram ser possível utilizar condições de pH alcalinas (até pH 9) e temperaturas até 85 °C. Esta foi a principal motivação para o presente trabalho.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é estudar o desempenho de uma nova xilanase comercial (xilanase X), fornecida pela Novozymes A/S numa pasta *kraft* de Eucalipto pré-deslenhificada com oxigénio (pasta O). Após o tratamento enzimático pretende-se aplicar os estágios de dióxido (D₀) e de extração alcalina aditivada com peróxido de hidrogénio (E_P), obtendo-se pastas com sequência de branqueamento OXD₀E_P, que por comparação com pastas OD₀E_P, (ou seja sem tratamento enzimático), permitirá avaliar o potencial de poupança de reagentes conseguido com a aplicação da xilanase X. Adicionalmente, pretende-se analisar as pastas e os respetivos filtrados resultantes dos ensaios com xilanase para melhor

compreender a atuação da enzima, nomeadamente no que respeita a alteração nos polissacarídeos e à libertação de lenhina.

Em geral, as pastas recebidas das unidades industriais são recolhidas em locais onde a consistência é de ~30% e são posteriormente lavadas no laboratório com água destilada para remover o *carryover*¹ e manter a sua estabilidade, mesmo em ambiente refrigerado. Os resultados apresentados e discutidos neste trabalho referem-se a ensaios laboratoriais usando pasta lavada e adicionando água destilada ou soluções tampão para manter a consistência de 10% durante o ensaio. Paralelamente, pretendeu-se efetuar ensaios usando pasta (não lavada) e filtrados tal qual recebidos da unidade fabril, expondo deste modo a xilanase às condições de *carryover* reais e assim avaliar o desempenho da mesma xilanase X sujeita a condições mais hostis. Tais resultados não serão apresentados no âmbito desta dissertação, para respeitar o termo de confidencialidade acordado. Pelo mesmo motivo, não serão apresentados os ensaios realizados *in situ* na unidade fabril usando a mesma xilanase X.

1.3. Organização da dissertação

A presente dissertação contempla seis capítulos. No capítulo primeiro, é feita uma contextualização do tema a tratar, bem como quais os objetivos pretendidos com o mesmo.

O segundo capítulo é referente à produção de pastas *kraft*, onde se descreve sucintamente os principais componentes da madeira, as principais etapas deste processo e as principais reações que dele fazem parte, bem como as suas desvantagens para o processo que se segue, o branqueamento.

O capítulo três é todo ele referente ao branqueamento, um dos mais importantes e dispendiosos processos para a obtenção de pasta branca. Aqui são referidos e evidenciados, sucintamente, os principais reagentes de branqueamento, sendo analisados com algum detalhe os estágios de branqueamento realizados laboratorialmente para a realização deste trabalho, bem como é feita uma pequena abordagem ao tema reversão da brancura.

¹ *Carryover* – Compostos residuais (reagentes e/ou produtos de degradação da lenhina) presentes na pasta pelo facto da lavagem fabril não ser totalmente eficiente.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

O quarto capítulo é reservado para a descrição da metodologia experimental utilizada na realização dos ensaios laboratoriais de branqueamento. É ainda abordada de uma forma sucinta a metodologia utilizada na caracterização das pastas.

Os resultados obtidos são apresentados e discutidos no capítulo cinco, sendo este iniciado pela caracterização da pasta original utilizada nos ensaios. Nele se desvenda o potencial de poupança de reagentes que foi possível obter através da utilização da xilanase X, bem como o ganho de brancura obtido. A caracterização das pastas e a análise dos filtrados obtidos é também apresentada e discutida de forma a entender melhor a atuação da xilanase nas fibras de pasta.

O capítulo seis é reservado para as principais conclusões advindas da realização deste trabalho, bem como são sugeridos alguns estudos complementares.

É posteriormente apresentada a bibliografia de suporte ao presente trabalho e nos anexos são detalhados os procedimentos experimentais, bem como os cálculos realizados.

2. PRODUÇÃO DE PASTAS KRAFT

Na presente dissertação são realizados diversos ensaios laboratoriais com pasta *kraft* de *Eucalyptus globulus*, pelo que, neste capítulo, será feita uma breve referência aos principais componentes desta madeira, às principais etapas do processo de cozimento *kraft* e às principais reações que nele ocorrem.

2.1. Química da madeira

A madeira é um material orgânico de origem biológica, higroscópico, resistente, altamente organizado a nível molecular e celular cuja composição química não pode ser definida com exatidão, uma vez que esta depende das condições de crescimento da árvore, do tipo de madeira (normal, de reação, folhosa ou resinosa), das diferentes partes da árvore (raízes, tronco, ramos e casca) e da sua idade (Fengel et al., 1989; Silva, 2010). A composição elementar da madeira, pode ser quantificada, em média, por 50% de carbono, 43% de oxigénio, 6% hidrogénio e os restantes 1% de azoto e compostos inorgânicos (Fengel et al., 1989). A nível molecular, esta é essencialmente constituída por substâncias de baixo peso molecular, como os extrativos (de origem orgânica) e as cinzas (matéria inorgânica) e as substâncias macromoleculares, que na sua maioria são a lenhina, a celulose e as hemiceluloses. A Tabela 2.1 apresenta as diferentes percentagens dos constituintes das diferentes madeiras (resinosas e folhosas) e da madeira de eucalipto português. Do ponto de vista da estrutura química, apenas a celulose é semelhante em todas as madeiras (Fengel et al., 1989). As substâncias de baixo peso molecular são caracterizadas por serem de fácil remoção através da utilização de solventes de polaridade adequada, uma vez que se alojam no lúmen das células e nos espaços vazios. Em contrapartida, para que as substâncias macromoleculares que constituem a parede celular de todas as madeiras possam ser removidas (nomeadamente a lenhina) durante os processos de cozimento e branqueamento, é necessário alterar a sua estrutura via química ou mecânica.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

Tabela 2-1. Composição química genérica da madeira (em base seca) de resinosas, folhosas e *Eucalyptus globulus* nacional. (adaptado de Carvalho, 1999;Fengel et al, 1989; Sjostrom, 1981).

Constituintes % (m/m)	Resinosas	Folhosas	<i>E.globulus</i>
Celulose	33-42	38-51	47-58
Glucuronoxilanas	-	20-30	12-24
Glucomananas	-	2-3	1
Galactoglucomanana	14-20	-	-
Arabinoglucoronoxilanas	7-11	-	-
Lenhina	27-40	21-31	20-30
Extratáveis	2-5	1-5	1-3

2.1.1. Celulose

A celulose é o componente presente em mais abundância na madeira, constituindo cerca de 40 a 50 % da sua massa seca. É um homopolímero formado por unidades de anidro-D-glucopiranosose repetidas, ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4)

Figura 2.1 (Sjostrom, 1981). Pelo tipo de ligação estabelecido, a unidade estrutural que se repete é a celobiose, um dissacarídeo (Carvalho, 1999; Koch, 2006; Sjostrom, 1981).

O comportamento dos grupos hidroxilos nas extremidades da cadeia é diferente, pertencendo um ao grupo terminal redutor, pois contém uma estrutura de hemiacetal cíclico, sendo o outro um grupo terminal não redutor (Carvalho, 1999).

Os grupos hidroxilo existentes têm forte tendência para formar ligações por pontes de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, que são responsáveis pela agregação das moléculas lineares de celulose entre si. Esta associação dá origem a microfibrilas que possuem zonas onde as moléculas de celulose estão preferencialmente ordenadas (zonas cristalinas) e outras zonas mais desordenadas (zonas amorfas) (Baptista, 2006; Carvalho, 1999). A celulose apresenta assim um grau de cristalinidade elevado, numa gama de 60 a 75%, dependendo da sua origem. Quanto maior for a cristalinidade maior será a densidade, rigidez e resistência à tração das fibras e menor a reatividade química e a capacidade de absorção de solvente (Carvalho, 1999; Fengel et al., 1989; Sjostrom, 1981).

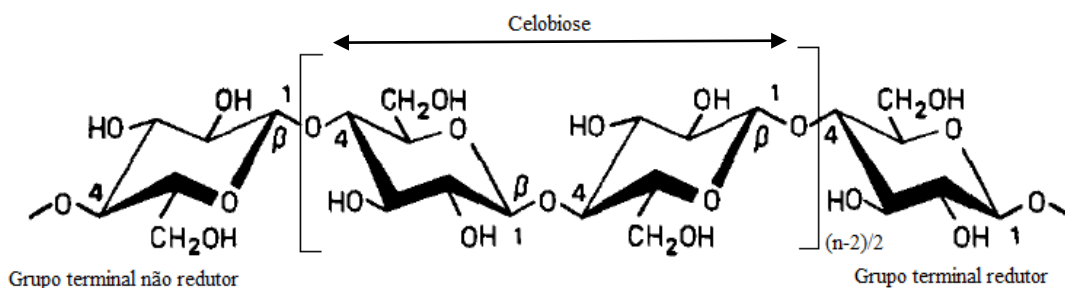


Figura 2.1. Estrutura da celulose (adaptado de Sjostrom, 1981).

2.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses constituem cerca de 20 a 30 % da massa seca da madeira (Sjostrom, 1981). Estas são polissacarídeos não celulósicos, constituídos por vários tipos de unidades de açúcares, estando localizadas também na parede celular da biomassa vegetal. Estes polissacarídeos podem ser constituídos por diversas combinações de monómeros: pentoses (como D-xilose e L-arabinose), hexoses (como D-glucose, D-manose e D-galactose) e pequenas quantidades de grupos ácidos (como ácido 4-O-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico) (Sjostrom, 1981).

As hemiceluloses, contrariamente à celulose são heteropolímeros ramificados de natureza amorfa e de baixo grau de polimerização (DP cerca de 200). Devido à sua estrutura amorfa, estas tornam-se fáceis de sofrer hidrólise por ácidos ou enzimas. A sua estrutura ramificada torna as hemiceluloses mais solúveis sendo mais suscetíveis a sofrer uma maior degradação que a celulose durante as operações de cozimento e branqueamento (Kim, 2013; Dean et al., 1997).

As hemiceluloses diferem na sua composição e estrutura dependendo da espécie de madeira, dentro da mesma espécie, das condições de crescimento, com o tipo de células e com o posicionamento na parede celular (Dean et al., 1997; Sjostrom, 1981). São designadas em função do monómero presente em maior quantidade, sendo as mais comuns nas resinosas a Galactoglucomanana e a Arabinoglucuronoxilana e nas folhosas a Glucuronoxilana e a Glucomanana. Sendo a matéria-prima desta dissertação o *Eucalyptus globulus*, apenas serão detalhadas as hemiceluloses de folhosas.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

As glucomananas (Figura 2.2) são polissacarídeos lineares com poucas ramificações, constituindo 2 a 5% da madeira de folhosas. Estas são compostas por unidades de β -D-glucopirranose e de β -D-manopirranose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4). A razão molar entre a glucose e a manose varia entre 1:2 e 1:1, dependendo da espécie de madeira (Sjostrom, 1981).

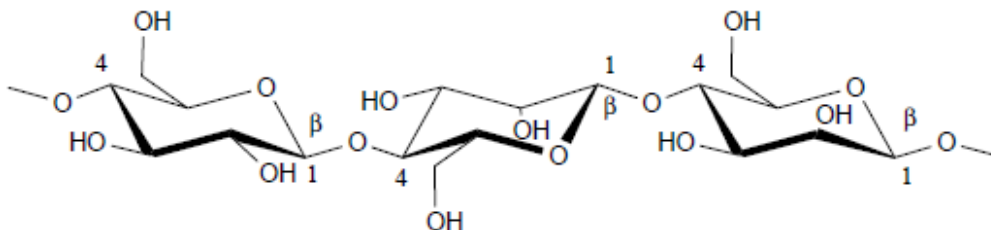


Figura 2.2. Estrutura de glucomananas de folhosas (adaptada de Laine, 2005).

Mesmo havendo diferenças qualitativas e quantitativas entre as hemiceluloses de madeiras de folhosas, o maior componente é a O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilana, muitas vezes designada simplesmente por Glucuronoxilana. As hemiceluloses constituídas à base de xilose, tanto nas madeiras de resinosas, como nas madeiras de folhosas são vulgarmente denominadas por xilanas. Dependendo da espécie, encontra-se entre 15 a 30 % de xilana nas madeiras de folhosas. A xilana é constituída por unidades de β -D-xilopiranosil unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) e ramificadas por ácidos metilglucurónicos e grupos acetilo, Figura 2.3. A xilana contém grupos acetilo nas posições C-2 e C-3 da xilose (normalmente sete por cada dez unidades de xilose), e como grupo substituinte unidades de ácido 4-Ometil-D-glucurónico associados à cadeia principal da xilana por ligações α (1 \rightarrow 2) (normalmente um grupo por dez unidades de xilose) (Sjostrom, 1981).

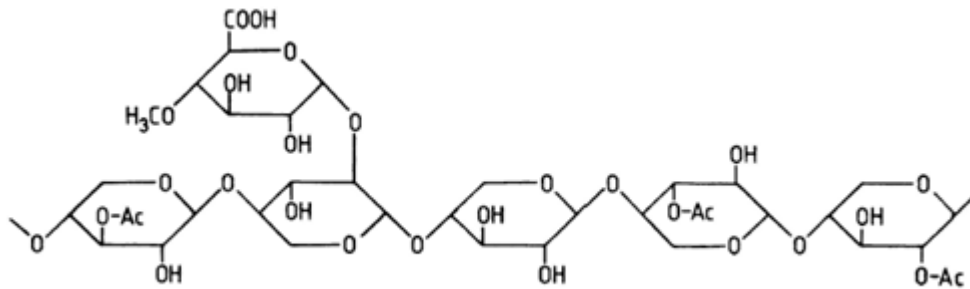


Figura 2.3. Estrutura da O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilana (adaptada de Carvalho, 1999).

No Eucalipto nacional a estrutura da glucuronoxilana apresenta algumas características diferenciadoras, Figura 2.4, tendo-se observado ligações adicionais de glucose e galactose em alguns dos grupos de ácido glucurónico (Evtuguin et al., 2003).

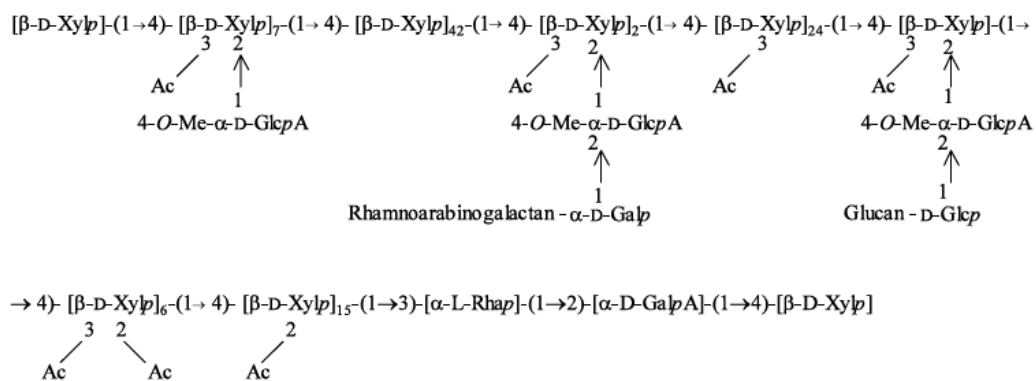


Figura 2.4. Fórmula molecular resumida da glucuronoxilanas de *E. globulus* (adaptada de Evtuguin et al., 2003).

2.1.3. Lenhina

A quantidade de lenhina presente na madeira é bastante variável, estando compreendida entre 20 a 40 %, dependendo do tipo de madeira (Fengel et al., 1989). A lenhina é um polímero bastante complexo de estrutura amorfa e tridimensional, é hidrofóbico e constituído por unidades precursoras de fenilpropano. É a “cola” das fibras da madeira, sendo o polímero capaz de manter as fibras unidas através de interações e ligações covalentes com as hemiceluloses. A lenhina está concentrada na lamela média mas é na parede celular

onde existe maior quantidade. A sua remoção, ou quebra das suas ligações durante o processo de cozimento, permite que as fibras se separem, levando à sua individualização. No entanto, este processo é bastante dificultado pelo facto da lenhina ser um polímero insolúvel em água e pouco reativo, exceto em condições químicas extremas. Desta forma, o processo de cozimento é mais facilitado quando o teor de lenhina é mais baixo (Biermann, 1996). As variações na reatividade química da lenhina dependem não só das ligações químicas entre os monómeros, mas também da posição 3 e/ou 5 dos grupos metoxilo no anel aromático – Figura 2.5. Assim, designa-se por lenhina do tipo hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) ou seringilo (S), conforme o monómero possua nenhum, um ou dois grupos metoxilo, respetivamente. A lenhina varia consoante a espécie de madeira, sendo a madeira de resinosas constituída maioritariamente por lenhina do tipo guaiacilo (G), enquanto que a lenhina das folhosas é constituída maioritariamente por lenhina do tipo serigilo (S) e guaiacilo (G) em proporções variáveis (de 4:1 a 1:2) (Koch, 2006; Sjostrom, 1981).

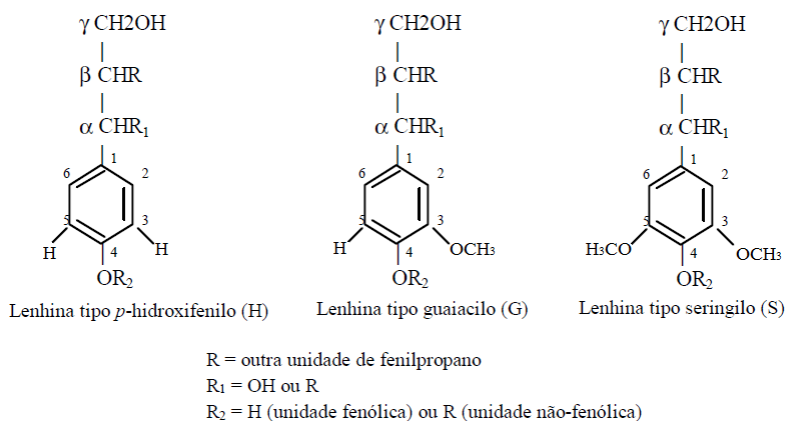


Figura 2.5. Representação dos diferentes tipos de lenhina (adaptado de Carvalho, 1999).

Os grupos funcionais principais são o metoxilo, hidroxilo fenólico, carbonilo e álcool benzílico. A sua frequência pode variar de acordo com a localização morfológica da lenhina, contribuindo os grupos hidroxilo e metoxilo, nas folhosas, respetivamente para 10 e 20% do seu peso molecular (Sjostrom, 1981).

2.2. Etapas do processo de cozimento *kraft*

O processo de cozimento *kraft* ou ao sulfato, ficou conhecido em 1879 quando um químico alemão, Dahl, decidiu utilizar sulfato de sódio para regenerar NaOH e constatou que, na verdade se formou Na₂S e a deslenhificação ocorreu muito mais rapidamente obtendo-se pastas mais resistentes – *kraft* significa forte em alemão e sueco (Biermann, 1996). Este processo de cozimento é responsável pela produção de mais de 75% da pasta de papel produzida no mundo (Boucher et al., 2014). O processo ao sulfato é um método de produção de pasta química que utiliza hidróxido de sódio e sulfato de sódio, a um pH superior a 12, dissolver a maior parte da lenhina presente na madeira (Biermann, 1996; Carvalho, 1999).

Sucintamente, este processo inicia-se com a remoção da casca dos toros de madeira e destroçamento dos mesmos (redução a estilhas, aparas ou cavacos), para facilitar a penetração dos reagentes na madeira e uniformizar os fenômenos de transferência de calor e massa (Biermann, 1996). De seguida ocorre a remoção do ar das aparas e sua saturação com vapor, através de uma pré-vaporização com vapor entre 100 e 105 °C, seguindo-se a impregnação das aparas no digestor com o licor branco (licor de cozimento) durante 20 a 45 minutos a uma temperatura entre 115 e 120 °C. O cozimento propriamente dito ocorre a uma temperatura que oscila entre 155 °C e 180 °C e a uma pressão elevada, entre 7 e 12 atmosferas. A reação de deslenhificação tem início ainda na fase de aquecimento, a cerca de 140 °C, não sendo conveniente usar temperaturas acima dos 180 °C pois seria excessiva a degradação do material celulósico (Sixta et al., 2006). A duração do cozimento oscila entre 1 e 3 horas, consoante o nível de deslenhificação que se pretende atingir. Como a seletividade do processo é baixa, a remoção da lenhina é sempre acompanhada da perda de polissacarídeos, não sendo por isso útil prolongar a operação em demasia (de um modo geral, remove-se cerca de 90% da lenhina inicial, o que corresponde a um valor do índice *kappa* que varia de 14 a 20 no caso das folhosas) (Biermann, 1996). O licor negro que se obtém após o cozimento é removido por extração seguindo para o ciclo de recuperação do licor e produção de energia. A pasta é lavada e crivada de modo a obter pasta “crua” pronta a seguir para o primeiro estágio de branqueamento (Sixta et al., 2006). As vantagens que mais se destacam deste processo, relativamente a outros, são (Biermann, 1996; Carvalho, 1999):

- a elevada resistência mecânica da pasta obtida;

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

- a tolerância à presença de casca na madeira;
- é aplicável a diversos tipos de madeira, independentemente das suas propriedades físico-mecânicas;
- apresenta um menor tempo de cozimento quando comparado com outros processos químicos;
- permite a recuperação de todos os produtos químicos envolvidos no cozimento.

As desvantagens que apresentam mais relevância são (Biermann, 1996):

- maior dificuldade no branqueamento das pastas;
- menores rendimentos devido a perdas de hidratos de carbono, especialmente nas resinosas;
- emissões bastante odoríferas devido à presença de enxofre.

As variáveis mais importantes durante o processo de cozimento kraft estão relacionadas com as condições de cozimento do digestor, o tempo e temperatura, com a razão líquido/madeira, a carga alcalina e índice de sulfureto, com a espécie de madeira, com a dimensão das aparas e a sua impregnação no digestor (Biermann, 1996; Carvalho, 1999). No que respeita às reações de deslenhificação, o cozimento *kraft* apresenta três etapas distintas – inicial, principal e residual (Carvalho, 1999; Sixta et al., 2006; Sjostrom, 1981):

- A fase inicial decorre durante o período de tempo em que a temperatura aumenta até cerca de 140°C. Aqui existe uma grande perda de hidratos de carbono e cerca de 10 a 15 % de remoção de lenhina. Esta fase também é caracterizada pelo elevado consumo de carga alcalina.
- A cerca de 140°C dá início a fase principal. Esta etapa é caracterizada pela elevada remoção de lenhina, sendo possível remover cerca de 70 % da lenhina da madeira. É aqui que a deslenhificação é mais seletiva e ocorre mais rapidamente. A alcalinidade efetiva sofre uma pequena diminuição e são removidos também alguns polissacarídeos.
- A fase residual, ou final como alguns lhe chamam, tem início após se ter atingido um grau de deslenhificação de cerca de 90%. É caracterizada por uma diminuição rápida da velocidade de deslenhificação, aumento do consumo de reagentes e pela remoção de polissacarídeos, fazendo com que exista uma diminuição do rendimento e uma

diminuição do peso molecular da celulose. Por isso, o processo de cozimento deve ser interrompido antes de se dar início à fase residual.

É apresentada na Figura 2.6 as diferentes fases de deslenhificação acima descritas e respectivas reações que ocorrem na madeira.

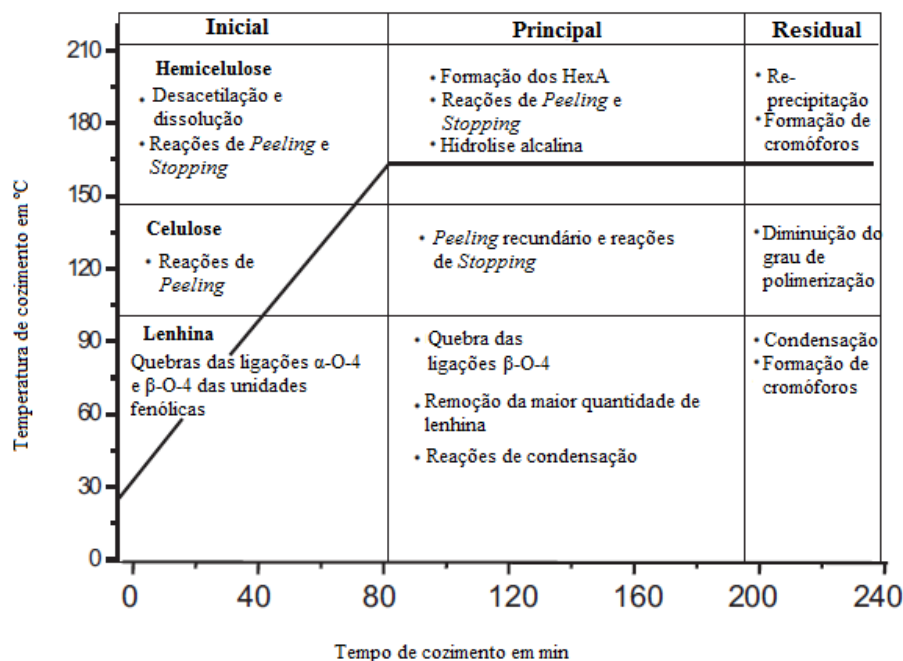


Figura 2.6. Esquema representativo das fases da deslenhificação e principais reações dos principais componentes da madeira (adaptado de Sixta et al., 2006).

2.3. Reações indesejáveis dos polissacarídeos

Durante o processo de cozimento, paralelamente às reações com a lenhina existem reações indesejáveis do licor com os polissacarídeos. A reatividade dos polissacarídeos depende da sua estrutura, nomeadamente, da sua morfologia, cristalinidade e grau de polimerização. No geral, as reações que ocorrem entre os polissacarídeos são as seguintes (Sixta et al., 2006):

- Hidrólise dos grupos acetilo das xilanas a uma temperatura superior a 70°C;
- Hidrólise das ligações glicosídicas terminais (*peeling*) a uma temperatura superior a 80°C;

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

- Hidrólise aleatória das ligações glicosídicas não terminais a temperatura superior a 140 °C – fragmentação do polímero;
- Dissolução de hemiceluloses;
- Eliminação de metanol através de resíduos de ácido 4-O-metilglucurônico e **formação de ácidos hexenurônicos**;
- **Readsorção das hemiceluloses na superfície das fibras**;
- Estabilização dos hidratos de carbono contra a oxidação;
- **Formação de compostos cromóforos.**

O cozimento *kraft* provoca perdas substanciais de polissacarídeos, podendo-se alcançar 20 % de perda da massa inicial da madeira (Carvalho, 1999). Estas perdas ocorrem principalmente nas etapas de deslenhificação inicial, com a perda de parte das hemiceluloses, e nas etapas de deslenhificação final, com a perda de alguma celulose (Baptista, 2006). Pelas suas características, as hemiceluloses são mais suscetíveis de sofrer um ataque alcalino que a celulose, dissolvendo-se a maior parte destas a temperaturas entre 100 e 130°C. Ainda assim, as xilanas são as hemiceluloses mais resistentes. A degradação das hemiceluloses consome hidróxido de sódio para a neutralização dos ácidos orgânicos formados. A celulose, embora mais resistente, também acaba por sofrer dissolução na parte final do processo, removendo-se cerca de 10 % da sua quantidade inicial (Carvalho, 1999). As glucomananas são menos estáveis que as xilanas, e por isso são praticamente todas degradadas, enquanto que cerca de metade das xilanas originalmente presentes na madeira são preservadas, apesar da diminuição do grau de polimerização e perda de grupos laterais (Sixta et al., 2006; Sjostrom, 1981). Todas estas degradações refletem-se na perda de rendimento processual e na redução do grau de polimerização, conduzindo a perda de qualidade da fibra (Baptista, 2006).

De todas estas reações, as que apresentam especial relevância no processo de branqueamento são a formação de ácidos hexenurônicos, a readsorção das hemiceluloses na superfície das fibras e a formação de cromóforos, merecendo uma especial atenção, e por isso serão detalhadas seguidamente.

2.3.1. Formação de ácidos hexenurónicos

As unidades de ácido 4-*O*-metilglucurónico, grupos laterais presentes ao longo da cadeia das xilanas (Figura 2.3 e Figura 2.4), são facilmente removidas por hidrólise alcalina a temperaturas elevadas, mas cerca de 25% a 40% da quantia inicial destes grupos permanecem na xilana devido ao decréscimo da alcalinidade do licor no fim do cozimento (Pinto, 2005). Uma fração destas unidades é convertida em ácidos hexenurónicos, através da eliminação de metanol Figura 2.7. A presença destes ácidos favorece o consumo dos reagentes de branqueamento, uma vez que estes possuem ligações duplas conjugadas que os tornam bastante reativos com reagentes eletrofílicos de branqueamento, sendo também associados à reversão de brancura (Sixta et al., 2006). Os ácidos hexenurónicos contribuem também para a formação de ácido oxálico originando problemas de *fouling*. A formação e estabilidade dos ácidos hexenurónicos é influenciada pelas condições de cozimento, principalmente pela temperatura e carga alcalina, tendo-se verificado que no caso da madeira de *E. globulus*, a quantidade de ácidos hexenurónicos aumenta com o decorrer do cozimento (Carvalho, 1999; Pinto, 2005) e já perto do final do cozimento é que cerca de 60% dos ácidos hexenurónicos formados são degradados (Sixta et al., 2006). Estes ácidos causam uma sobrevalorização da lenhina residual na pasta crua, usando a técnica da determinação do índice kappa (IK - indica o valor do teor de lenhina residual), pois também reagem com o permanganato de potássio.

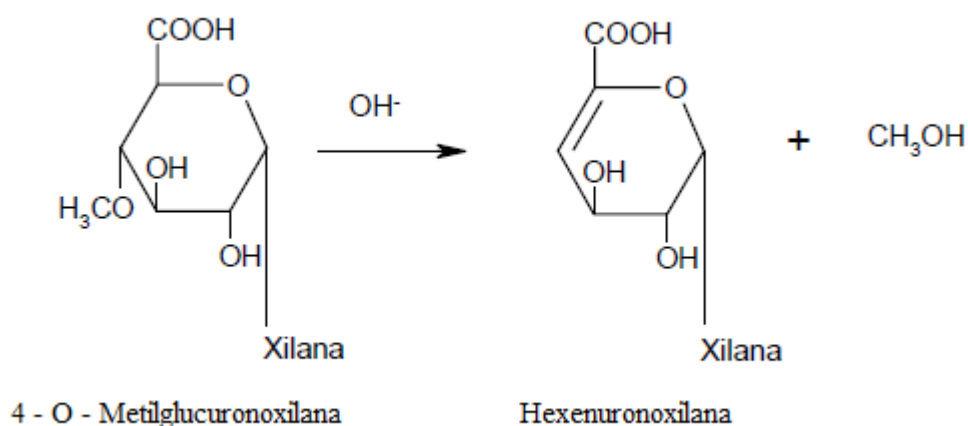


Figura 2.7. Representação da formação de ácido hexenurónico em meio alcalino a partir de ácido 4-*O*-metilglucurónico (adaptado de Pinto, 2005).

2.3.2. Readsorção das hemiceluloses na superfície das fibras

Na fase final do cozimento, uma parte da xilana dissolvida precipita na superfície das fibras, aumentando a resistência à transferência de massa através da parede da fibra. Tal ocorrência deve-se à diminuição da alcalinidade do licor de cozimento e à clivagem parcial dos grupos laterais das hemiceluloses, o que diminui o seu grau de ramificação (Pinto, 2005; Sixta et al., 2006). A reprecipitação das xilanas tem efeitos positivos e negativos. Os positivos advêm da maior ligação interfibras, o que provoca uma melhoria nas propriedades mecânicas e de refinação da pasta, bem como o aumento do rendimento. Porém, a readsorção de xilanas na superfície das fibras restringe a passagem de lenhina de alto peso molecular, formando uma barreira física à sua extração pelos reagentes de branqueamento, o que faz aumentar o consumo destes (Pinheiro, 2014).

2.4. Reações com a lenhina

No processo de cozimento *kraft* é necessário degradar e solubilizar a lenhina, para que esta possa ser removida. Tal é conseguido através da fragmentação das suas macromoléculas durante este processo. A lenhina, como referido anteriormente, tem uma estrutura bastante complexa, tornando assim o processo de desfragmentação também complexo (Sixta et al., 2006). Esta fragmentação ocorre pela quebra nas ligações éter e ligações carbono-carbono (Figura 2.8). As reações que constituem a base da degradação/dissolução da lenhina são (Sixta et al., 2006; Sjostrom, 1981):

- Ionização de grupos fenólicos;
- Clivagem das ligações éter α -arilica e β -O-4;
- Libertação dos grupos fenólicos livres.

As ligações éter α -O-4 e β -O-4 são as mais comuns na lenhina, constituindo cerca de 65% de todas as ligações (Sixta et al., 2006). As quebras das ligações são causadas pelos iões hidroxilo (OH-) e pelo ião hidrossulfureto (HS-). Em meio alcalino, os grupos OH fenólicos ionizam-se, potenciando a eliminação do substituinte na posição α , ou em estruturas com ligação dupla conjugadas com o anel do substituinte da posição γ . As ligações do tipo éter α -arilo são facilmente quebráveis em meio alcalino, enquanto as éter β -arilo necessitam de outras do tipo carbono-carbono são estáveis nas mesmas condições, sendo necessário

condições mais drásticas e a presença do íão HS⁻ que atua como catalisador (Sixta et al., 2006; Sjöstrom, 1981). As ligações covalentes entre as hemiceluloses e a lenhina, que são encontradas na parede da fibra, têm a designação de complexos LCC, e são provenientes da madeira nativa ou formadas no processo de cozimento. Estas ligações são de extrema importância para o processo de branqueamento, uma vez que estas consomem reagentes e promovem a instabilidade da brancura.

A degradação da lenhina é acompanhada pela libertação de grupos fenólicos e redução da massa molecular, fatores que aumentam a solubilidade dos fragmentos de lenhina no licor. É bem conhecido o aumento do conteúdo de grupos fenólicos livres na lenhina, mantendo-se superior na lenhina dissolvida em relação à lenhina residual na pasta em todas as etapas do cozimento (Pinto, 2005).

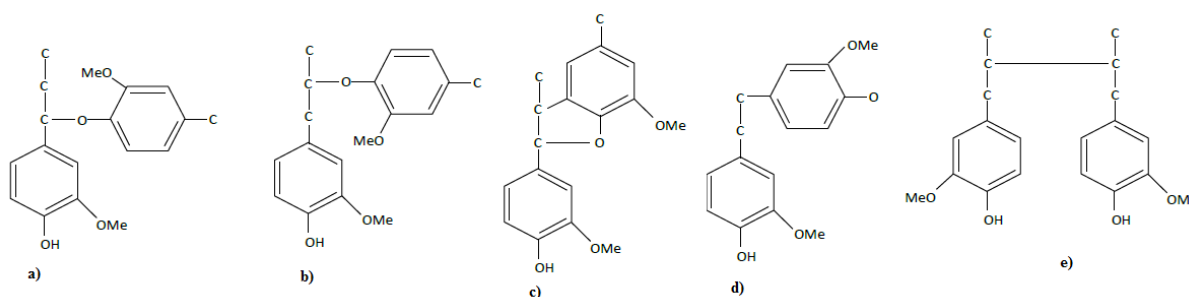


Figura 2.8. Representação das ligações éter e ligações carbono-carbono que ocorrem na lenhina. Em que a) é a ligação α -O-4; b) é a ligação β -O-4; c) é a ligação β -5'; d) é a ligação β -1' e e) é a ligação β - β (adaptada de Esteves, 2013).

2.5. Origem dos Compostos Cromóforos

Os compostos cromóforos, tal como o nome indica, são responsáveis pela cor da pasta e absorvem a luz na região ultravioleta ou visível do espectro (Dyer, 2004; Sixta et al., 2006). A cor da madeira é influenciada por diversos fatores, como a espécie, a idade e os processos químicos e mecânicos a que é sujeita. Os seus principais constituintes são potenciais contribuintes para a cor, nomeadamente a lenhina (Carreira, 2009).

Após a etapa de cozimento, as pastas não branqueadas (ou pastas cruas) apresentam uma cor castanha escura. Tal facto deve-se, por um lado, à presença de compostos de ferro, casca de madeira, extratáveis, incozidos e outras sujidades provenientes da madeira e de

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

fontes externas. Além disso, as pastas *kraft* de folhosas contêm ainda 1,5 a 4 % de lenhina, contribuindo para a cor característica das pastas não branqueadas (Sixta et al., 2006). Os grupos cromóforos presentes na lenhina absorvem a luz de comprimentos de onda específicos para dar estados eletrônicos excitados. Estes podem perder a sua energia por meio de reação química, por processos térmicos, ou podem emitir luz por meio de fluorescência ou fosforescência (Dyer, 2004).

Embora as estruturas exatas dos cromóforos não sejam todas conhecidas, sabe-se que existe uma grande diversidade destes grupos, sendo que a distinção entre eles se baseia no tipo de grupos funcionais conjugados (ligações duplas, essencialmente), como se pode ver na Figura 2.9, onde são apresentados alguns cromóforos.

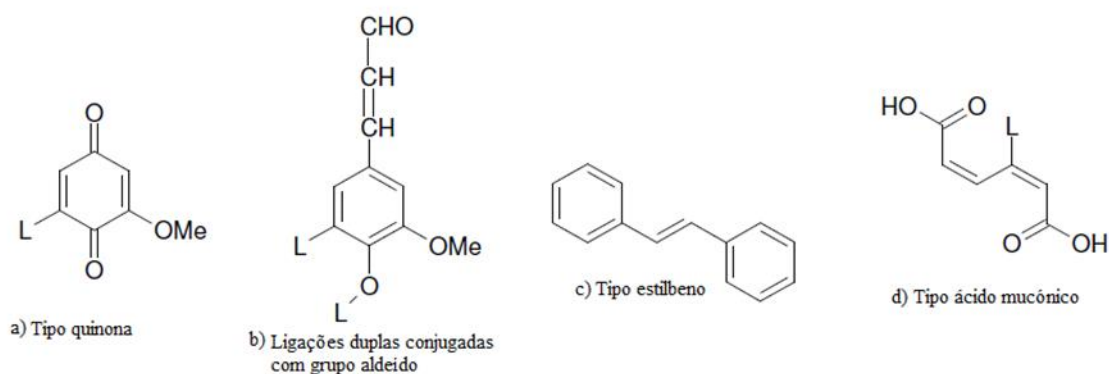


Figura 2.9. Representação de alguns cromóforos (adaptado de Dyer, 2004).

A lenhina é uma macromolécula difícil de estudar devido à sua estrutura complexa e ao imenso número de possíveis locais de reação. Em geral, existem várias configurações de lenhina responsáveis pela absorção de luz, tais como as ligações duplas conjugadas com anéis aromáticos, a oxidação pelo ar dos catecóis, os estilbenos, as quinonas, as metileno quinonas, radicais livres, e complexos de metais de transição com estruturas de catecol, todas elas formadas ao longo do cozimento (Dyer, 2004).

Em comparação com outros métodos de produção de pasta, a lenhina residual em pasta *kraft* não branqueada tem sempre um coeficiente de absorção específica mais elevado - isto é, a pasta apresenta uma cor mais escura. A razão para isto pode ser visto na formação de compostos insaturados e altamente conjugados. O potencial de oxidação de fenóis é substancialmente reduzido sob condições alcalinas; daí a formação de quinonas e estruturas

condensadas mais elevadas a partir de unidades de lenhina fenólicas, favorecidas na presença de oxigénio ou ar, de acordo com o Figura 2.10.

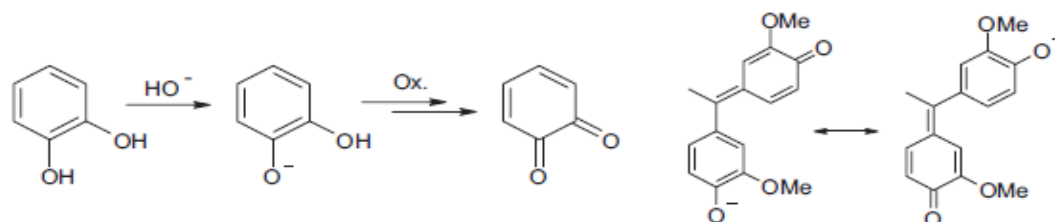


Figura 2.10. Formação de cromóforos a partir de subestruturas de lenhina fenólica (adaptado de Sixta et al., 2006).

A formação de tais estruturas - em conjunto com a alteração dentro da própria lenhina residual - são uma razão para a diminuição da capacidade de branqueamento de pastas *kraft*. Os cromóforos podem ser isolados e analisados após hidrólise com complexos de BF_3 -ácido acético (Sixta et al., 2006).

A quantidade e tipo de materiais absorventes de luz, ou cromóforos, como normalmente são designados, pode ser caracterizada pelo coeficiente de absorção de luz, em diferentes comprimentos de onda. Relativamente à celulose e à hemicelulose, tem sido demonstrado que têm uma absorção relativamente baixa, tanto na região visível do espectro, como na região ultravioleta do espectro. A lenhina, por outro lado, tem uma absorção classificada como sendo baixa na região de comprimento de onda visível, mas aumenta rapidamente com a diminuição do comprimento de onda nas regiões ultravioleta (Dyer, 2004). Dos testes já realizados em pastas *kraft*, é possível verificar pela literatura existente que quanto maior for a remoção de cromóforos, melhor é a estabilidade e brancura da pasta resultante (Sixta et al., 2006).

3. BRANQUEAMENTO

O branqueamento das pastas lenhocelulosicas é o tratamento químico que faz aumentar a brancura e brilho das pastas. Esta é uma etapa bastante dispendiosa e importante, principalmente se a pasta tiver como destino final o papel de impressão e escrita (Biermann, 1996). A brancura, segundo a *International Organisation for Standardisation* (ISO), é definida como a refletância, quando se faz incidir um feixe de luz azul monocromático, para um comprimento de onda de 457 nm (Sixta et al., 2006). Como já foi referido, as pastas não branqueadas apresentam uma cor bastante acentuada e escura, especialmente as pastas *kraft*. A continuação do cozimento para remover os principais agentes corados, que não os polissacarídeos, conduz a uma inevitável diminuição significativa da celulose, devido à sua degradação. Portanto, será necessário recorrer a outros reagentes e/ou processos, com maior seletividade para remover os grupos responsáveis pela cor da “pasta crua” (Sixta et al, 2006). A branqueabilidade de uma pasta é a aptidão da pasta para atingir um valor estabelecido de brancura sendo traduzida pela quantidade de reagente consumido (Pinto, 2005).

Nos primórdios da tecnologia de branqueamento, era utilizado um só estágio com hipoclorito, mas a evolução foi no sentido do uso de vários estágios de branqueamento, com diferentes reagentes (Sixta et al., 2006; Suess, 2010). A substituição completa de cloro por dióxido de cloro (branqueamento ECF) foi o passo chave na redução dos níveis de organoclorados em efluentes de fábricas de pasta, tornando-se esta a tecnologia dominante neste ramo industrial (Sixta et al., 2006). A utilização de agentes de branqueamento tais como o oxigênio, o ozono e o peróxido de hidrogênio, sem recurso a nenhum reagente derivado do cloro, levou ao desenvolvimento do denominado branqueamento TCF (Sixta et al., 2006). A Tabela 3-1 apresenta uma listagem dos agentes de branqueamento tipicamente utilizados.

Tabela 3-1. Principais agentes de branqueamento e reatividade para com a lenhina e polissacarídeos (adaptada de Bajpai, 2012; Sixta et al., 2006; Suess, 2010).

Designação do estágio de branqueamento	Características do estágio de branqueamento
C	Estágio com Cloro, com reação electrofilica que ocorre nas estruturas oleofinicas, aromáticas e nos HexA, a pH ácido.
D	Estágio com Dióxido de Cloro, com reação eletrofilica, a pH inferior a 5, com ocorrência da reação nos grupos fenólicos livres, nas ligações duplas e nos HexA.
H	Estágio alcalino com Hipoclorito, com reações nucleofilicas que ocorrem nos grupos carbonilo e nas ligações duplas conjugadas.
P	Estágio alcalino com Peróxido de Hidrogénio, com reações nucleofilicas que ocorrem nos grupos carbonilo e nas ligações duplas conjugadas.
O	Estágio alcalino com oxigénio para a oxidação de lenhina, através de reações nucleofilicas que ocorrem nos grupos fenólicos livres e nas ligações duplas.
Z	Deslenhificação com ozono gasoso, a pH ácido, com reações eletrofilicas que ocorrem nas estruturas oleofinicas, aromáticas e nos HexA.
X	Tratamento com enzima (xilanasas ou outras) com aptidão para melhorar a acessibilidade à lenhina por eliminação de carboidratos precipitados.
E	Extração alcalina, através da utilização de NaOH para solubilização da lenhina, a pH entre 9,5 e 11.

Este branqueamento sequencial é normalmente designado através das letras apresentadas na Tabela 3.1, por exemplo ODED. É possível enriquecer uma sequência com a adição de outro reagente, por exemplo um estágio E_P, significa uma extração alcalina reforçada com peróxido de hidrogénio, pelo que, a sequência anterior terá agora a designação ODE_PD (Suess, 2010).

3.1. Tratamento Enzimático

As enzimas, pela sua crescente facilidade de aquisição e pelas suas características específicas tornaram-se num precioso auxiliar do branqueamento, contribuindo também para a redução do consumo de reagentes. Os benefícios da sua utilização dependem do tipo de

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

sequência de branqueamento utilizada e dos objetivos a atingir no final (brilho, brancura, etc) (Bajpai, 2005; Bajpai 2012).

As enzimas são biocatalisadores extremamente eficientes e altamente específicos para o tipo de reação que catalisam, o que as torna ferramentas exclusivas para modificar componentes específicos presentes nas fibras, sendo eficientes mesmo em pequenas doses (Ko et al., 2009; Viikari et al., 2002). As enzimas são denominadas pelo sufixo -ase, acrescentado ao nome do substrato que descreve a sua atividade (Esteves, 2013). Na Tabela 3.2 são apresentadas as principais aplicações de enzimas no sector da pasta e papel, bem como as suas funções.

Tabela 3-2. Classificação e aplicação de enzimas em diversos processos na indústria papelreira (adaptado de Novozymes A/S, 2010; Pinheiro, 2014; Skals et al., 2008).

Classe	Enzima	Processo	Função
Oxidoredutases (Reações de oxidação-redução)	Lacase	Modificação da superfície das fibras	Aumento da resistência mecânica do papel
	Catalase	Remoção de peróxido	Aumento de vida útil dos equipamentos, impedindo a corrosão.
	Amilase	Remoção de amido	Poupança de químicos de destintagem e aumento da eficiência
		Preparação de amido	Preparação de revestimento por modificação da estrutura do amido
Hidrolases (Reações de hidrólise)	Celulase	Modificação da superfície das fibras	Aumento da resistência mecânica do papel.
		Refinação de PTM*	Poupança de energia pela suavização da superfície das fibras.
		Drenagem	Poupança de energia na drenagem pela melhoria da estrutura das fibrilas.

Celulase e Hemicelulase	Destintagem	Poupança de químicos de destintagem convencionais pela hidrólise da celulose e libertação da tinta
Lipase	Controlo de <i>Pitch</i> ** em PTM*	Diminuição dos tempos de paragem e poupança de agentes de limpeza por hidrólise do <i>pitch</i> .
Xilanase	<i>Bleach Boosting</i>	Poupança de reagentes químicos através da degradação das xilanas e melhor extração da lenhina.
Esterase	Controlo de <i>Stickies</i> ***	Poupança de químicos e energia durante os tempos de paragem pela hidrólise de PVAc (Poliacetato de vinilo).
Hemicelulase	Drenagem	Poupança de energia na drenagem pela melhoria da estrutura das fibrilas.
Protease	Controlo de lamas	Redução do consumo de biocidas pela degradação de bactérias ligadas à superfície das fibras.

*PTM - Pastas Termomecânicas; ***Pitch* – material resinoso que forma aglomerados causando problemas nos equipamentos e diminuindo a qualidade do papel; ****Stickies* – material proveniente de adesivos, revestimentos ou ligantes que contêm grandes quantidades de PVAc que se deposita nos equipamentos.

A poupança de reagentes químicos é um dos fatores mais aliciantes para o recurso a enzimas, nomeadamente a xilanas, por parte das indústrias papeleiras (Bajpai, 2012). A nível industrial foram utilizadas primeira vez em 1994 num pré-branqueamento de pasta *kraft* e desde então o processo de crescimento foi tal que já está implementado à escala comercial. A grande vantagem da utilização da xilanase é a redução da utilização de dióxido de cloro na

primeira etapa de branqueamento, diminuindo a formação de compostos organoclorados (Ko et al., 2009).

As xilanases são as enzimas que catalisam a hidrólise da xilana (Valenzuela et al., 2013). Esta hidrólise é bastante complexa, sendo necessárias diferentes enzimas que atuam sinergicamente. Estas enzimas são as endoxilanases (endo- β -1,4-xilanase, EC 3.2.1.8), as β -xilosidase (xilana 1,4- β -xilosidase, EC 3.2.1.37), as α -glucuronidase (α -glucosiduronase, EC3.2.1.139), as α -arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosidase, EC3.2.1.55), e a acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) (Ahmed et al., 2009). As endoxilanases catalisam a hidrólise do esqueleto de xilana para produzir xilo-oligossacáridos, os quais por sua vez podem ser convertidos em xilose pela intervenção de β -xilosidase, tal como se pode ver na Figura 3.1, tornando-se estas duas xilanases as principais responsáveis pela hidrólise da xilana (Ahmed et al., 2009).

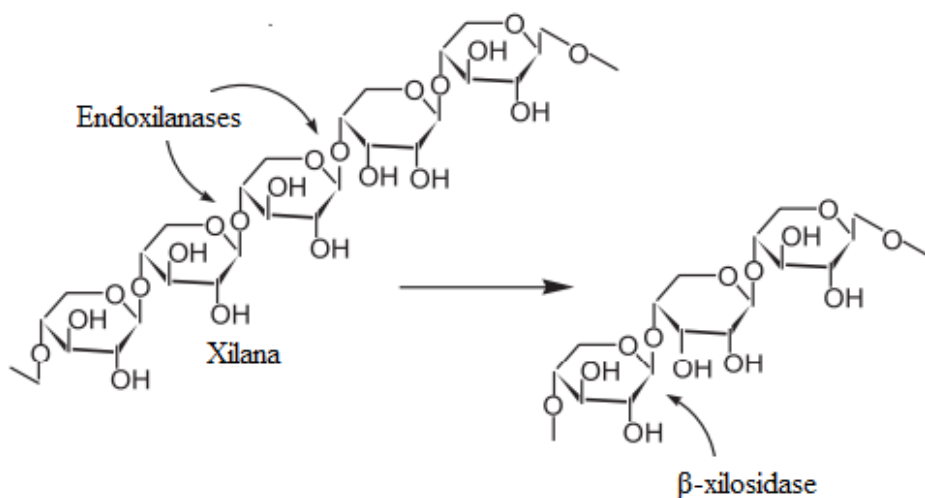


Figura 3.1. Estrutura da molécula de xilana e ação das principais xilanases (adaptado de Gomes et al., 2006).

Os primeiros tratamentos com xilanase foram realizados a um pH levemente ácido e as pastas resultantes eram de difícil refinação. Os esforços feitos para colmatar este problema resultaram numa nova geração de enzimas que operam em condições próximas às existentes na pasta crua, ou seja, enzimas que se mantêm ativas a altas temperaturas, com alta estabilidade e atividade em pH alcalino. É ainda necessário que o preparado enzimático não

contenha celulases (para evitar o ataque às cadeias de celulose e conseqüentemente a diminuição da viscosidade e a perda de rendimento), tenha xilanases muito ativas (para reduzir o custo), tenha baixo peso molecular (para facilitar a sua difusão nas fibras) e tempos de retenção pequenos (Gomes et al., 2006; Torres et al., 1999).

Foram realizados diversos estudos sobre o papel das xilanases no branqueamento de pasta, podendo existir um ou mais mecanismos de atuação como os que se descrevem a seguir (Roncero et al., 1999). A xilanase não ataca diretamente os cromóforos presentes na lenhina, embora o índice kappa (proporcional ao teor de lenhina residual) diminua após este tratamento, o que indica que a xilanase contribui para a deslenhificação da pasta (Eriksson, 1997). Por outro lado, e uma vez que as xilanas se encontram em menor quantidade e têm um peso molecular inferior ao da celulose, observa-se, em geral, um aumento da viscosidade de soluções de pasta, após a ação hidrolítica da xilanase (Eriksson, 1997). A hidrólise seletiva da xilana re-precipitada na superfície das fibras leva a uma melhor permeabilidade da fibra, aumentando assim a acessibilidade dos reagentes de branqueamento à lenhina e facilitando a remoção de produtos de degradação de lenhina. Em paralelo, reforça a extratibilidade dos LCC o que facilita a deslenhificação da pasta durante as etapas de branqueamento químico subsequentes. Concomitantemente, a hidrólise (limitada) da xilana no interior da fibra leva à solubilização dos produtos de hidrólise que podem conter lenhina ou cromóforos derivados de hidratos de carbono (tais como os ácidos hexenurônicos das pastas produzidas por via alcalina). Toda esta forma de atuação faz impulsionar o branqueamento, aumentando o efeito dos subsequentes agentes químicos de branqueamento e a branqueabilidade das pastas (Ko et al., 2009; Shatalov et al., 2006; Shatalov et al., 2007).

É estabelecido na literatura que quanto maior for o teor de xilana na pasta, maior será o benefício da utilização de xilanases no branqueamento. A xilanase é considerada mais eficaz em fibras curtas que em fibras longas, uma vez que as folhosas apresentam maior teor de xilana que as resinosas, sendo portanto, maior a poupança de reagentes de branqueamento (Eriksson, 1997). Para o mesmo tipo de madeira, o teor de xilana na pasta *kraft* depende fortemente da alcalinidade efetiva. Quanto mais baixa for a alcalinidade, maior é o teor de xilana e mais benéfica se torna a utilização de xilanases. Essa eficácia pode ser até 3 vezes maior, do que usando elevada carga alcalina efetiva no cozimento (19 - 22 %) pois grande parte da xilana é solubilizada nestas condições (Eriksson, 1997).

Os efeitos da enzima podem variar dependendo do local da sequência onde é aplicada. Vários estudos realizados comprovam que a xilanase, quando aplicada depois da deslenhificação com oxigénio, é bastante eficaz em processos de branqueamento ECF, podendo-se obter poupanças entre 20 a 25% de dióxido de cloro em pastas de folhosas, enquanto que em pastas de resinosas é possível poupar cerca de 15%. Existem também relatos de que há aumento da resistência ao rasgamento (Roncero et al., 1999; Shatalov et al., 2006; Tolan et al., 1996). Tal pode ser explicado porque a deslenhificação com oxigénio permite que o cozimento se efetue com uma alcalinidade efetiva mais baixa e que este processo seja parado para valores de índice kappa mais elevados (Eriksson, 1997). Nos processos TCF, a combinação da xilanase com produtos de branqueamento à base de oxigénio, hidrogénio e ozono, podem melhorar substancialmente a capacidade de branqueamento das pastas, aumentando desta forma o nível máximo de brancura final (Shatalov et al., 2006).

Este tratamento também pode ser aplicado no final da sequência de branqueamento, tendo a designação de pós-branqueamento. Neste caso, o principal objetivo é promover uma maior estabilidade da brancura, nomeadamente através da remoção dos ácidos hexenurónicos (Esteves, 2013; Pinheiro, 2014).

No presente trabalho será estudado o efeito da xilanase após um estágio de deslenhificação com oxigénio.

3.2. Dióxido de Cloro

O dióxido de cloro é um agente de branqueamento de extrema importância, devido à sua elevada seletividade para a oxidação de estruturas cromóforas, fazendo com que este seja o reagente de primeira escolha tanto para deslenhificação como para branqueamentos ECF (Sixta et al., 2006; Suess, 2010). Como um agente de branqueamento, o dióxido de cloro tem um número de propriedades muito atraente. É um composto bastante seletivo, sendo a sua reação predominante com a lenhina e não com os polissacarídeos. O dióxido de cloro é também capaz de oxidar os extratáveis que resistiram ao cozimento. Os produtos da reação compreendem uma mistura de produtos de oxidação que contêm grupos hidroxilo, carboxilo ou carbonilo que são mais hidrofílicos do que os compostos originais e, são facilmente removidos em posteriores lavagens ou em extrações alcalinas (Gierer, 1986). O dióxido de

cloro reage com os ácidos hexenurónicos de modo a formar dicarboxilicos clorados e não clorados, tal como se pode observar na Figura 3.2 (Azevedo, 2011).

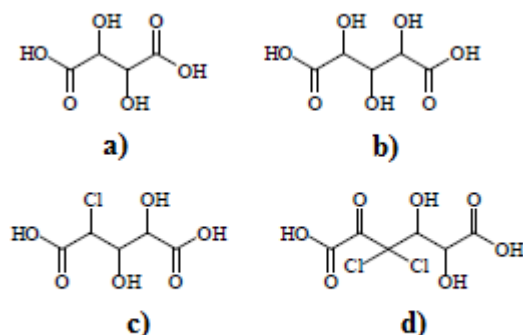


Figura 3.2. Principais produtos formados na reação do dióxido de cloro e os ácidos hexenurónicos. Em que a) é o ácido tetrátrico, b) é o ácido pentátrico, c) é o ácido 2-cloro-2-deoxipentátrico e d) é o ácido 3-deoxi-3,3-dicloro-2-oxoexárico.

O dióxido de cloro é um radical com um lugar vago para um eletrão nas suas orbitais exteriores, tal como se pode ver na Figura 3.3 onde são descritas as estruturas de ressonância do dióxido de cloro.

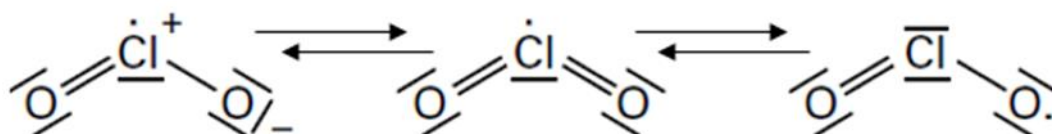


Figura 3.3. Estruturas de ressonância do dióxido de cloro (adaptado de Suess, 2010).

O potencial de oxidação do ClO₂ a ClO₂⁻ é muito menor que o potencial de oxidação do Cl₂ a Cl⁻, o que indica que o dióxido de cloro tem uma reatividade menos agressiva que o cloro. O estado de oxidação do átomo de cloro na molécula de ClO₂ é +4. Portanto, esta molécula pode aceitar um total de cinco eletrões para a sua redução para o ião cloreto - Equação 1 (Suess, 2010).



No branqueamento, a carga de dióxido de cloro é geralmente expressa como "cloro ativo". Apesar de não ser aplicado cloro no branqueamento, o termo é ainda muito utilizado pela indústria da pasta e do papel. A carga de dióxido de cloro pode ser expressa como carga de cloro ativo em unidades de massa (em % ou em kg / t de pasta) multiplicando a massa de dióxido de cloro pelo fator de 2,63.

Ao contrário do peróxido de hidrogênio, o dióxido de cloro reage preferencialmente com os grupos fenólicos, Figura 3.4, em detrimento das quinonas, provocando uma remoção incompleta destas estruturas e promovendo a formação de estruturas insaturadas nas xilanas. Por isso, o dióxido de cloro é muitas vezes considerado como inadequado num último estágio de branqueamento, uma vez que provoca uma maior instabilidade da brancura da pasta (Suess, 2010). Como se pode ver na Figura 3.4, as reações de branqueamento (oxidação da lenhina) em condições ácidas também dão origem à formação de ácido hipocloroso (HClO) e de ácido cloroso (HClO₂). Estes últimos podem originar aniões clorito ClO²⁻, dependendo do valor de pH (pKa = 3.4):

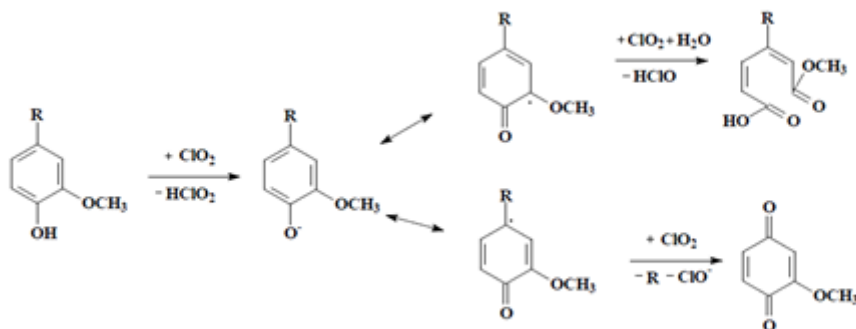


Figura 3.4. Reação de oxidação de estruturas de lenhina fenólicas com dióxido de cloro (adaptado de Suess, 2010).

O ácido hipocloroso atua como um agente oxidante levando à formação de produtos organoclorados (na reação com a lenhina ou com os polissacarídeos, nomeadamente os apresentados na Figura 3.2). A Equação 3 mostra o equilíbrio entre o cloro e o ácido hipocloroso – pKa = 1.8 (Sixta et al., 2006; Kolar, 1983):



Por sua vez, anião clorito sob condições acídicas sofre reações de dismutação e pode dar origem a clorato (ClO_3^-) e ácido hipocloroso - Equação 4 (Kolar, 1983).



Por outro lado, para valores de pH mais baixos, a oxidação do clorito pelo ácido hipocloroso pode aumentar a eficiência do processo de branqueamento, através da regeneração de dióxido de cloro (Equação 5):



Em meio neutro ou alcalino pode ocorrer a indesejável decomposição do ClO_2 formação de clorato, inútil para a ação de branqueamento.



Assim, o perfil de pH afeta muito o desempenho do branqueamento com ClO_2 . Para uma maior eficiência do dióxido de cloro, é importante encontrar condições que sejam menos favoráveis à formação de clorato, e que sejam mais favoráveis para a destruição de lenhina sem originar muita matéria organoclorada. A pH elevado, a eficiência é baixa devido à decomposição do ClO_2 (Eq. 6) e à formação de clorato e de clorito – Eq. 6 e Eq. 2. Quando o meio é bastante ácido (p.e. pH ~2), a reação é favorecida no sentido da formação de ácido hipocloroso (Eq. 4), sendo possível desta forma obter um aumento de eficiência de branqueamento, uma vez que o cloro é um agente despolimerizador da lenhina (Eq. 3). A grande desvantagem é a produção dos compostos organoclorados (Sixta et al., 2006). Parece quase impossível evitar a produção de subprodutos clorados sem o impacto negativo para o processo de oxidação da lenhina. Por isso, é recomendado terminar o primeiro estágio de dióxido (D_0) com o valor de pH entre 2,5 e 3 e os estágios subsequentes D_1 e D_2 a pH entre 3 e 4 para máxima eficiência (Suess, 2010).

Apesar da sua seletividade, o dióxido de cloro não consegue uma remoção completa da lenhina. Estudos indicam que o dióxido de cloro é, por um lado, um reagente de eleição para o branqueamento, e, por outro, há limitações na degradação completa da lenhina. Nos instantes iniciais, o dióxido de cloro reagirá muito rápido. Uma vez que os sítios reativos da lenhina residual são consumidos, qualquer reação adicional se torna muito lenta. Na prática, a oxidação de lenhina com dióxido de cloro atinge um ponto final - para além deste ponto,

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

mesmo quantidades muito elevadas de produtos químicos não conseguem degradar mais a lenhina residual. As estruturas de lenhina oxidadas precisam de ser removidas (por extração) e a lenhina remanescente "ativada" por oxidação adicional.

3.3. Extração alcalina

O estágio E (extração alcalina) permite a extração dos compostos degradados da lenhina, que, de outro modo, levariam ao aumento do consumo de reagentes de branqueamento em etapas subsequentes. A oxidação da lenhina com dióxido de cloro gera uma grande quantidade de lenhina de baixo peso molecular, compostos facilmente removidos com lavagem. Paralelamente, existe uma parte da lenhina residual já oxidada, que não é possível remover, uma vez que o seu peso molecular não é suficientemente baixo para que ocorra a dissolução a pH ácido. A oxidação da lenhina faz aumentar a sua solubilidade em condições alcalinas, sendo necessário menos quantidade de agente oxidante no estágio de branqueamento subsequente. Tornou-se usual que a seguir a um estágio de oxidação se realize uma extração alcalina (Biermann, 1996; Sixta et al., 2006). A temperatura na fase E situa-se entre 75 e 90 ° C, enquanto o pH é tipicamente cerca de 11, no início e cerca de 10 no final. O pH determina a quantidade de compostos dissolvidos e está diretamente relacionado com a carga de NaOH aplicada no estágio E (Sixta et al., 2006; Suess, 2010)

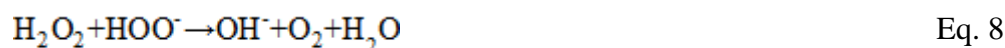
A carga de NaOH depende do *carry-over* de ácido depois do estágio D e do teor de ácidos carboxílicos. Por isso, o aumento da carga deste componente tem um impacto limitado na remoção da lenhina. Portanto, em vez de se aplicar maior carga de hidróxido de sódio, utilizam-se quantidades moderadas de peróxido de hidrogénio (Sixta et al., 2006).

Para diminuir a quantidade de dióxido de cloro usada num branqueamento, e consequentemente diminuir os custos e a carga de poluentes AOX nos efluentes, é importante adicionar oxidantes ao passo de extração, para degradar a lenhina e os cromóforos. O uso de oxigénio e H₂O₂ na extração alcalina reforça a extração alcalina "simples", enriquecendo-a de modo a obter uma maior deslenhificação, sendo possível uma melhoria de brancura até 10 pontos. Esta vantagem na brancura ainda é visível após os estágios subsequentes com dióxido de cloro, sendo também benéfica no que diz respeito à estabilidade operacional do processo de branqueamento (Sixta et al., 2006).

Neste trabalho é aplicada extração alcalina com reforço de peróxido de hidrogénio. Em condições alcalinas, o peróxido de hidrogénio está em equilíbrio com o anião hidroperóxido (HOO^-) que é a espécie ativa responsável pela ação do branqueamento - Equação 7 (Sun et al., 1999). Este anião reage rapidamente com os compostos de lenhina de modo a formar lenhina de baixo peso molecular, de modo a obter compostos oxidados mais solúveis em água, facilitando assim a sua remoção.



A pH muito alcalino, o peróxido de hidrogénio reage com o anião hidroperóxido (Equação 8) (Sun et al., 1999) diminuindo a quantidade de peróxido disponível no processo de branqueamento:



A temperatura superior a 110°C dá-se a clivagem homolítica em radicais hidroxilo- Equação 9 (Suess, 2010).



A decomposição do peróxido de hidrogénio é acelerada por metais de transição como o cobre, ferro, manganês. É comum a aplicação de um estágio quelante prévio para desativar a atividade catalítica dos metais. As condições acídicas de um estágio D_0 permitem a remoção da maior parte destes metais pelo que a sua presença residual não é muito problemática numa sequência ECF (Carvalho, 1999; Pinheiro, 2014).

Os radicais hidroxilo gerados pela decomposição de peróxido de hidrogénio não são seletivos pelo que são responsáveis não só pela deslenhificação mas também pela degradação dos polissacarídeos e redução da viscosidade da pasta.

Quando usado nos estágios de deslenhificação e no branqueamento de pastas químicas, o peróxido de hidrogénio produz um efluente de cor menos acentuada que o dióxido de cloro, reduz a carga de poluição do sistema de tratamento de efluentes, e melhora a estabilidade da brancura (Sun et al., 1999).

3.4. Reversão da brancura

A estabilidade da brancura da pasta pode ser afetada por diversos fatores, tais como a temperatura, a humidade, a exposição à luz e o próprio envelhecimento ao longo do tempo

(Sêco, 2008). A reversão da brancura é a perda de brancura por parte de uma pasta. A perda de brancura de uma pasta pode ocorrer durante os processos de secagem, armazenamento ou transporte. Mais do que obter uma elevada brancura, é de extrema importância conseguir que essa brancura se mantenha estável (Oliveira, 2010).

O processo de reversão de brancura implica a formação de estruturas cromóforas, que são caracterizadas pela capacidade de absorverem luz na região do ultravioleta ou visível, conferindo uma cor acastanhada à pasta (Oliveira, 2010). A reversão da brancura de uma pasta química branqueada pode ser atribuída à sua composição química. Assim, a presença de componentes como a lenhina residual, lenhina precipitada, grupos oxidados na celulose, hemiceluloses e ácido hexenurônico, extratáveis e metais podem afetar a estabilidade da brancura da pasta (Sêco, 2006).

A reversão de brancura pode ser quantificada de forma intuitiva através da perda de brancura em termos percentuais relativamente à brancura inicial da folha, depois de esta ter sido exposta a condições severas de temperatura e humidade (90 a 100°C e 100% de humidade), sendo este método designado por método térmico-húmido. Este método de envelhecimento acelerado é o considerado mais fiável para simular as condições de envelhecimento reais (Suess, 2010). Outra forma de quantificação é através do *PC number* (*Post Color number*) utilizando a refletância antes e depois do ensaio de envelhecimento acelerado (Oliveira, 2010; Suess, 2010) - Equação 10:

$$PC=100\times(k/s \text{ depois da reversão}-k/s \text{ antes da reversão}) \quad \text{Eq. 10}$$

Em que $k/s = \frac{(1-R_{\infty})^2}{2 \times R_{\infty}}$ e onde R_{∞} é a refletância obtida de um macete de folhas para um comprimento de onda igual a 475 nm, geralmente denominado de Brancura ISO (%), k é o coeficiente de absorção e s é o coeficiente de dispersão (Suess, 2010).

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo, é descrita a metodologia seguida para este estudo, onde se faz uma breve referência à proveniência da matéria-prima utilizada e onde são abordados os métodos utilizados no branqueamento e na caracterização das pastas e dos filtrados obtidos.

4.1. Matéria-prima

A pasta utilizada para realizar o presente estudo, foi recolhida após um estágio com oxigénio para pré-deslenhificação da pasta crua e foi gentilmente fornecida por uma fábrica nacional que usa madeira de *Eucalyptus globulus* e o cozimento *kraft*. A Figura 4.1 apresenta o esquema processual fabril da zona após a secção do cozimento e crivagem, onde se inclui as torres de armazenamento de pasta, o reator de pré-deslenhificação com oxigénio e a prensa de lavagem da pasta. O objetivo final deste estudo era aproveitar o tempo de residência da pasta na torre T2 para efetuar o tratamento enzimático.

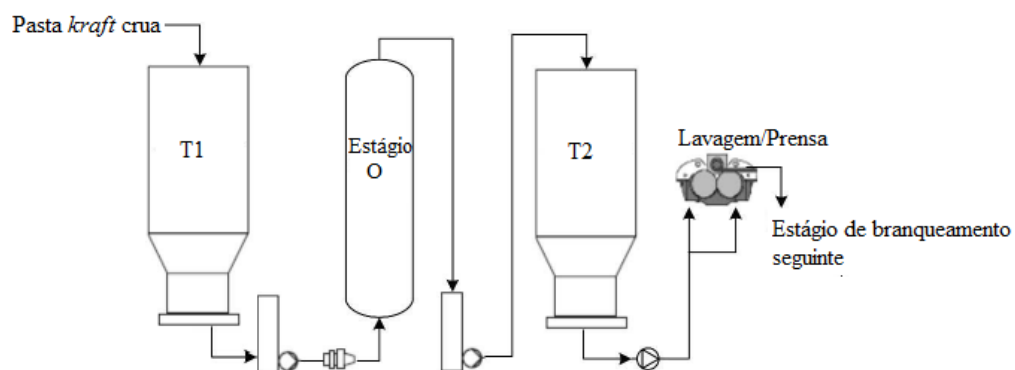


Figura 4.1. Representação típica da zona de tratamento de pasta após o cozimento, numa fábrica com pré-deslenhificação com oxigénio, em que T1 e T2 são as torres de armazenamento de pasta a alta consistência antes e após o estágio O (adaptado de Pinheiro, 2014).

Recolheram-se duas pastas (P1 e P2) em alturas distintas em virtude da quantidade de pasta P1 não ter sido suficiente para todos os ensaios, nomeadamente para avaliação do rendimento. As pastas foram imediatamente lavadas em laboratório, com água destilada, com vista a aumentar a sua estabilidade no tempo, e foram armazenadas com uma consistência de ~30%, a 4°C, sem exposição à luz.

A Figura 4.2 ilustra a metodologia usada nos ensaios.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

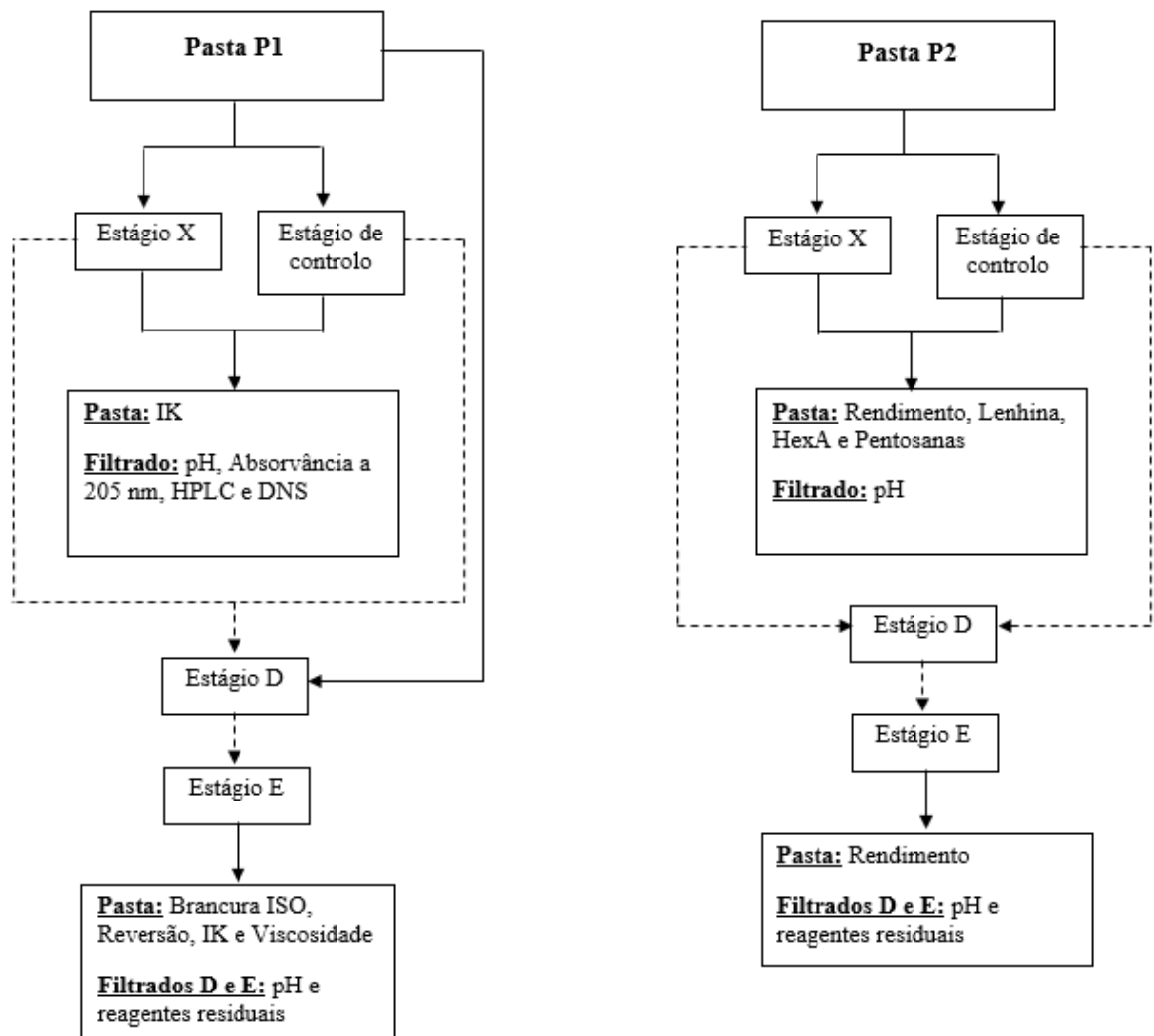


Figura 4.2. Metodologia experimental.

4.2. Estágios de Branqueamento

Os ensaios efetuados à pasta para simular os estágios de branqueamento fabris foram concretizados com o auxílio de sacos de polietileno, onde foram colocadas as devidas quantidades de pasta e reagentes. A suspensão foi homogeneizada à mão e os sacos foram fechados e colocados num banho com controlo de temperatura e agitação, durante o tempo requerido para cada ensaio. No final separaram-se as fases por filtração: pasta e filtrado. A pasta foi lavada com água destilada e colocada novamente em sacos de polietileno para o estágio de branqueamento seguinte, ou colocadas no frigorífico para uma posterior caracterização. O filtrado dos estágios X foi colocado em frascos, no congelador, para manter as suas características o mais intactas possível. Nos outros ensaios mediu-se o pH e inutilizou-

se o filtrado. Nos Anexo I.1 e Anexo I.2 encontram-se os procedimentos experimentais detalhados, referentes a cada estágio, onde se descreve a preparação dos ensaios, a preparação das soluções necessárias, a determinação das concentrações dos reagentes químicos de branqueamento e as massas a pesar.

Todos os ensaios de branqueamento foram realizados a 10% de consistência.

4.2.1. Tratamento enzimático

Uma vez que o principal objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do tratamento enzimático na diminuição da quantidade (e custos) de dióxido de cloro no branqueamento, o estágio X foi aplicado imediatamente após a pré-deslenhificação com oxigênio. A suspensão líquida enzimática foi fornecida pela Novozymes A/S, que será doravante designada por xilanase X. Tendo em conta as condições na torre de armazenamento T2 e dado que já era conhecido o desempenho da enzima e a sua estabilidade a diferentes temperaturas (Pinheiro, 2014) realizaram-se ensaios onde se estudou a variação do pH e de carga enzimática, mantendo fixo a temperatura (88°C) e o tempo (60 min) – Tabela 4.1.

Tabela 4-1. Condições de operação para a sequência de branqueamento OXD₀Ep.

	Estágio X (88°C, 60min)		Estágio D (85°C, 120min)	Estágio E (70°C, 80min)	
Pasta	pH	Dose enzimática (kg/t)*	Cl ₂ ativo (%)	NaOH (%)	H ₂ O ₂ (%)
	-	-	1,2; 1,5; 1,8; 2,2		
P1	8	0; 0,067; 0,2	1,2; 1,5		
	9	0; 0,067; 0,134; 0,2	1,2; 1,5	1,2	0,3
	9,5	0; 0,134; 0,2	1,2; 1,5		
	10	0; 0,134; 0,2	1,2; 1,5		
P2	9	0; 0,067; 0,134	1,2		
	8	0; 0,2	-	-	-
	10	0; 0,134	-	-	-

*kg de enzima por tonelada de pasta “seca ao ar” (correspondente a uma humidade de 10%); as pastas com carga 0 de enzima são os ensaios de controlo.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Para avaliar o resultado da ação enzimática, efetuaram-se as seguintes análises:

i) filtrados residuais - medição da absorvância a 205 nm, que permite averiguar se a lenhina está a ser removida, e quantificação de monossacarídeos (método DNS e HPLC); uma vez que a enzima poderá também libertar oligossacarídeos, fez-se um ensaio adicional de hidrólise enzimática no filtrado, tendo o resultado sido novamente analisado por HPLC.

ii) pastas – determinação da lenhina residual (Klason + solúvel), índice kappa (IK), ácidos hexenurónicos (HexA), pentosanas, viscosidade e rendimento.

Em paralelo, efetuaram-se ensaios de controlo, com as mesmas condições operatórias mas sem a adição de enzima e assim poder ser eliminada a influência do pH e da temperatura face à acção enzimática.

4.2.2. Sequência OD₀EP e OXD₀EP

Antes do tratamento enzimático, construiu-se a curva de branqueamento da pasta para se conhecer a sua branqueabilidade usando dióxido de cloro com diversas cargas (1,2 a 2,2 % como cloro ativo) seguido da extração alcalina – Tabela 4.1. Esta curva também permitiu seleccionar a carga de dióxido de cloro para os ensaios seguintes. O tempo e a temperatura da foram determinados em função das condições utilizadas à escala industrial – Tabela 4.1.

Após o estágio D₀, mediu-se o pH do filtrado para verificar se este se encontrava entre 2,5 e 3, e determinou-se a concentração residual de dióxido de cloro. Na extração alcalina, as condições operatórias utilizadas foram definidas com base em valores de referência industriais – Tabela 4.1. No final deste estágio mediu-se o pH para verificar se se encontrava acima de 10,5 (para evitar reprecipitação da lenhina dissolvida), e determinaram-se as concentrações residuais de hidróxido de sódio e de peróxido de hidrogénio. No Anexo I.1.5 e Anexo I.1.6 encontram-se os procedimentos experimentais mais detalhados, para ambos os estágios.

4.3. Caracterização das pastas

4.3.1. Brancura ISO

A brancura ISO, como já referido anteriormente, é definida como a refletância da luz visível, quando se faz incidir um feixe de luz azul monocromático, para um comprimento de onda de 457 nm. A sua determinação foi efetuada segundo a norma ISO 2469, num espectrofotómetro L&W Elrepho Modelo SE 070-1, disponível no RAIZ (Eixo, Aveiro),

sendo feitas quatro medições de brancura distribuídas por duas folhas de pasta de 200 g/m² de gramagem, produzidas segundo a norma ISO 3688. O procedimento completo de preparação para medição de brancura pode ser consultado no Anexo I.4.3. Os resultados apresentados correspondem à média destas 4 determinações.

4.3.2. Reversão da brancura

Para medir a reversão da brancura, recorreu-se ao método térmico-húmido, usando equipamento gentilmente disponibilizado pelo Raiz. Este método consiste em colocar as folhas de pasta numa grelha no interior de uma câmara durante uma hora, a uma temperatura de 100°C e 100% de humidade (vapor de água), conforme o procedimento TAPPI 260. Após este período de tempo, as folhas secam numa câmara ventilada durante uma hora, nas condições da sala condicionada (23 ± 1°C, 50 ± 2% de humidade), sendo depois prensadas. Por fim determina-se novamente a brancura ISO (como descrito na secção 4.3.1).

Os resultados da reversão foram avaliados através do *Post Color number (PC number)* – Eq. 10.

4.3.3. Índice kappa

Para determinar o teor de lenhina residual das pastas é comum recorrer à determinação do índice kappa, (ou índice micro-kappa quando a lenhina residual apresenta valores baixos), uma vez que a lenhina é suscetível de ser oxidada por vários agentes, nomeadamente o permanganato de potássio, em condições ácidas. Segundo a norma NP 9186, o índice kappa é definido como o número de mL de uma solução de KMnO₄ (0,1 N) consumidos por grama de pasta absolutamente seca, sob condições normalizadas (25°C, 10 min), sendo o resultado corrigido para um consumo de 50% de permanganato. A descrição detalhada deste procedimento, encontra-se no Anexo I.4.1. Como as ligações duplas conjugadas existentes nos componentes da pasta afetam esta determinação, levando à obtenção de um resultado por excesso, fez-se também, nalgumas pastas, a determinação do teor de lenhina residual e do teor de ácidos hexenurónicos.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

4.3.4. Determinação da lenhina

A lenhina residual nas pastas foi determinada através dos métodos TAPPI T222 e TAPPI UM 250, que permitem determinar a lenhina insolúvel (Klason) e a lenhina solúvel, respetivamente, usando H₂SO₄ para hidrolisar os polissacarídeos numa amostra de pasta. A descrição dos procedimentos experimentais destas determinações encontram-se no Anexo I.4.5.

4.3.5. Ácidos hexenurónicos

A quantificação dos ácidos hexenurónicos na pasta é baseada na sua hidrólise com uma solução de cloreto de mercúrio e acetato de sódio, combinada com espectrofotometria U.V do hidrolisado. A concentração de ácidos hexenurónicos é dada pela seguinte expressão (Equação 11):

$$C_{\text{HexA}}(\text{mmol/kg}) = \frac{0,278 \times (A_{260} - 1,2 \times A_{290}) \times V_{\text{hidrolisado}}}{m_{\text{pasta seca}}} \quad \text{Eq. 11}$$

em que A₂₆₀ e A₂₉₀ são, respetivamente, as absorvâncias nos comprimentos de onda 260 e 290 nm. O procedimento completo pode ser consultado no Anexo I.4.4.

4.3.6. Determinação do teor de pentosanas

A quantificação das pentosanas dá uma informação aproximada do teor de hemiceluloses total, pois estas são os polissacarídeos em maior quantidade nas pastas de folhosas. Quando submetidas a hidrólise ácida, estas pentosanas formam essencialmente xilose. Nas condições da norma TAPPI T 223 a hidrólise das pentosanas por meio de ácido clorídrico em ebulição, converte ainda a xilose em furfural que depois é separado por destilação. O destilado é posteriormente sujeito a uma reação com uma solução de orcinol-cloreto férrico, obtendo-se desta forma um composto de cor azulada que é analisado por espectroscopia visível a 630 nm. Para se poder determinar a quantidade de xilose, é necessário construir uma curva de calibração usando amostras de xilose com diferentes massas (em vez de pasta) que são submetidas ao mesmo procedimento experimental. O valor final da percentagem mássica de xilose na amostra de pasta é convertida em percentagem de xilana,

pressupondo hidrólise completa. Cerca de 0,25 a 0,5% de pentosanas presentes na amostra resistem à hidrólise realizada, não sendo contabilizadas. O contrário acontece com os ácidos urónicos, que também contribuem para a formação de furfural, com um rendimento entre 33 e 45% e são contabilizados como xilanas (Carvalho, 1999).O procedimento para determinação do teor de pentosanas pode ser consultado em detalhe no Anexo I.4.8

4.3.7. Viscosidade

A viscosidade intrínseca da pasta está diretamente relacionada com o grau de degradação dos polissacarídeos, especialmente da celulose, pois este é o polímero de maior massa molecular e o que existe em maior quantidade (75 a 85 % da massa de pasta). Desta forma, é possível ter uma ideia da extensão do ataque aos polissacarídeos. A viscosidade é determinada através da norma ISO 5351, segundo a qual se compara o tempo de escoamento de um determinado volume de solução de pasta celulósica, num viscosímetro capilar, com o tempo de escoamento do solvente puro. Este solvente é a Cuprietenodiamina (CED) que é um complexo de cobre e amina, o que o torna capaz de solubilizar a celulose. O procedimento experimental seguido, pode ser consultado no Anexo I.4.2.

4.3.8. Determinação do Rendimento

A metodologia utilizada para determinar o rendimento é igual à utilizada para a realização dos estágios de branqueamento, com a diferença de que quando se efetua a lavagem da pasta, é utilizada uma filtração a vácuo com um funil de placa porosa, de modo a não perder a pasta.

O rendimento é determinado através da equação 12.

$$\text{Rendimento \%} = \frac{\text{massa de pasta final em base seca (g)}}{\text{massa de pasta inicial em base seca (g)}} \times 100 \quad \text{Eq. 12}$$

4.4. Caracterização dos filtrados

4.4.1.1. Açúcares redutores pelo método DNS

O método do ácido dinitrossalicílico é frequentemente utilizado para determinar a quantidade de monossacarídeos numa amostra líquida. O método utilizado no decorrer deste estudo, foi adaptado de (Miller, 1958), podendo o procedimento experimental ser consultado no Anexo I.4.6. O objetivo era avaliar a quantidade de monossacarídeos libertados pela ação enzimática e dissolvidos nos filtrados, dado que isso se refletiria no rendimento em pasta. Para estes ensaios foi necessário construir curvas de calibração para este método colorimétrico com o reagente de DNS usando amostras de xilose com diferentes massas, de forma a obter uma relação entre a absorvância lida e a xilose na amostra.

Dado que a xilanase X também poderia libertar xilooligossacarídeos (XOS) na sua ação sobre as pastas (não quantificados por este método), tentou-se utilizar, nos filtrados, uma betaxilosidase (que hidrolisaria os XOS) mas os resultados deram indicação de que esta enzima não estava ativa. Como alternativa, usou-se a xilanase X numa amostra de filtrado, em condições de elevada atividade (pH 8; 2h, 88°C) e avaliou-se o teor de monossacarídeos pelo método do DNS antes e após esta etapa.

O desempenho da xilanase X e da betaxilosidase também foi testado através desta metodologia, usando como substrato duas xilanas padrão comerciais, provenientes de “*oat spelts*” e “*beechwood*”.

4.4.1.2. Açúcares por HPLC

O método de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) é um dos mais eficientes na determinação de diferentes açúcares, apesar de ser um método um pouco mais demorado quando comparado com o método do DNS, por exemplo. Além disso, tem como vantagem permitir a identificação dos monossacarídeos.

A amostra a analisar, sendo sólida e contendo polissacarídeos, deve ser previamente hidrolisada com ácido sulfúrico (p.e. pelo método usado para a determinação da lenhina) sendo necessário uma posterior correção do pH na solução líquida resultante, pois a coluna utilizada neste método opera a pH entre 5 e 6. As especificações da coluna e a metodologia adotada podem ser consultadas no Anexo I.4.7.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais ensaios realizados com a xilanase X (uma suspensão líquida) bem como as características iniciais da matéria-prima utilizada (pastas O) e as das pastas produzidas: OX, ODE e OXDE.

5.1. Caracterização das pastas utilizadas nos ensaios

As características iniciais das pastas utilizadas no decorrer dos ensaios laboratoriais são apresentadas na Tabela 5-1. As pastas P1 e P2 são ambas provenientes da mesma unidade fabril e recolhidas no mesmo local, após a pré-deslenhificação com oxigênio. Foram lavadas em laboratório para remoção do *carryover* e consequente aumento da estabilidade no tempo.

Tabela 5-1. Caracterização das pastas utilizadas nos ensaios.

Pasta	Viscosidade (mL/g)	IK	Brancura ISO (%)	Brancura ISO após reversão (%)
P1	1065	10,0	53,3	52,4
P2	1080	11,3	-	-

As diferenças apresentadas a nível de viscosidade e índice kappa estão dentro da gama de variabilidade normal deste processo, sendo esta afetada não só pela variabilidade da madeira (*E. globulus*) mas também por oscilações nas variáveis processuais. A pasta P2 não foi utilizada para análise de brancuras antes ou após os estágios XDE.

5.2. Sequência ODE

Na pasta P1 foram realizados ensaios de branqueamento com dióxido de cloro, seguido de extração (pastas ODE) com vista a traçar a curva de branqueamento e poder posteriormente avaliar a poupança de reagentes, quando é utilizado um pré-tratamento enzimático (sequência OXDE). A Figura 5.1 representa a evolução da brancura obtida na pasta ODE e a respetiva reversão de brancura através do *PC number*. Foram usadas quatro

cargas de dióxido de cloro distintas (1,2; 1,5; 1,8; 2,2%, como cloro ativo). Na ordenada na origem estão representados os valores da pasta O de partida.

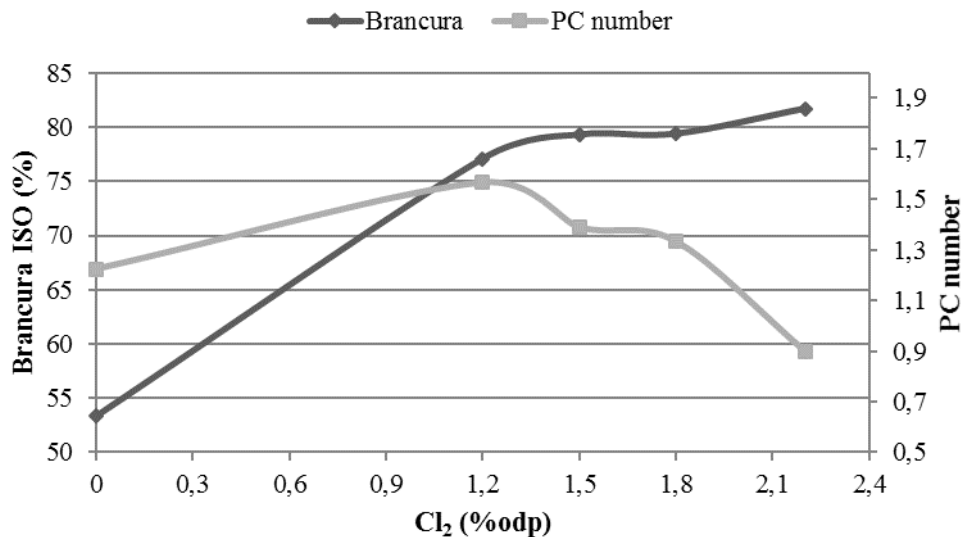


Figura 5.1. Evolução da brancura ISO das pastas ODE e respetiva reversão de brancura com a variação da carga de dióxido de cloro (expressa como cloro ativo).

Como se pode confirmar, esta sequência permite obter um ganho de brancura superior a 20 pontos. Além disso, a brancura aumenta quando se aumenta a carga de dióxido de cloro aplicada, enquanto a reversão de brancura diminui. Este resultado deve-se à crescente remoção de cromóforos, principalmente lenhina (Suess, 2010). A evolução é mais acentuada para as menores cargas aplicadas (isto é, a brancura nesta zona revelou ser mais sensível à carga aplicada), pelo que foi possível estabelecer a carga de 1,5% como a mais adequada para prosseguir com os restantes ensaios sem tratamento enzimático prévio. Aplicando o estágio X, poder-se-ia usar uma carga de dióxido de cloro inferior, permitindo obter o potencial de poupança de reagente de branqueamento. Na zona que revelou menor sensibilidade (carga superior a 1,5%) o efeito positivo da xilanase no ganho de brancura poderia ser menos notado.

O IK indica o teor de lenhina residual presente na pasta, pelo que o seu valor deve diminuir à medida que os cromóforos são removidos (Nascimento, 2005). Tal fato é observado na Figura 5.2 que é consistente com os resultados apresentados para a brancura. Para a carga de dióxido de cloro mais baixa, houve uma redução de ~5 unidades de IK.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

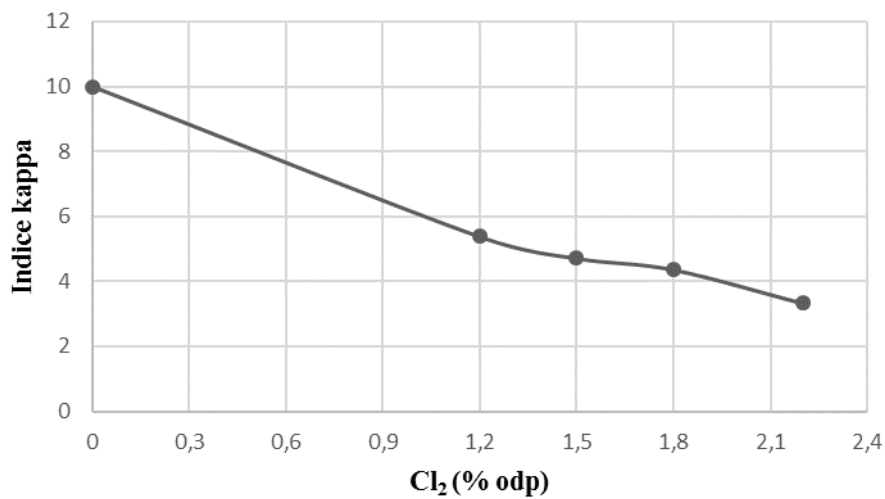


Figura 5.2. Evolução do índice kappa com a carga de dióxido de cloro aplicada (expressa como cloro ativo).

A degradação dos polissacarídeos é geralmente avaliada através da evolução da viscosidade de soluções de pasta. A Figura 5.3 mostra esta evolução com a carga aplicada de dióxido de cloro. Pode-se concluir que os estágios de branqueamento D₀ e E_P deram origem a uma redução de mais de 200 pontos na viscosidade. Apesar do dióxido de cloro ser reconhecido como um reagente bastante seletivo, a adição de peróxido de hidrogénio no estágio de extração alcalina poderá ter contribuído para a degradação dos polissacarídeos (Sun et al., 1999).

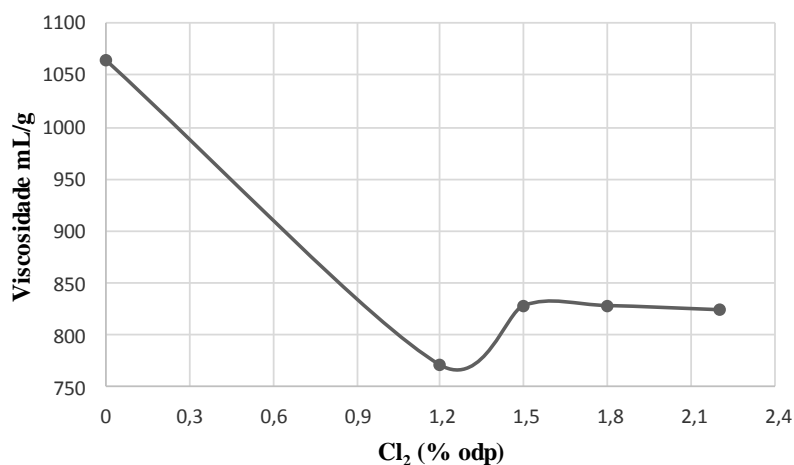


Figura 5.3 Evolução da viscosidade com a carga de dióxido de cloro aplicada (expressa como cloro ativo).

Os resultados apresentados nesta secção podem ser consultados detalhadamente em anexo – Anexo II.1.

5.3. Sequência OXDE

Nesta secção é avaliada a poupança de reagente de branqueamento que se poderá obter como resultado da ação da xilanase X em pastas pré-deslenhificadas com oxigénio. É também estudado o efeito sobre o índice kappa, a viscosidade, o teor de ácidos hexenurónicos e de lenhina e o tipo de açúcares libertados. O tempo e a temperatura utilizados em todos os ensaios de tratamento enzimático foram 1 h e 88°C, respetivamente. Fez-se variar a dose de enzima entre 0,067 e 0,2 kg/t odp e o pH da suspensão entre 8 e 10 (ensaios designados por LX – L de pasta lavada e X de tratamento enzimático). Após o estágio X e respetiva lavagem foi aplicado um estágio de dióxido de cloro, seguido de lavagem e de uma extração alcalina, conforme descrito na secção 4.2. A carga de dióxido de cloro foi de 1,2 % (como cloro ativo). Nos ensaios de controlo (iguais condições operatórias mas sem enzima – ensaios LC) utilizaram-se as cargas de dióxido de cloro de 1,5 e 1,2 % (Cl₂ ativo). Por comparação com os resultados obtidos usando enzima, estes ensaios de controlo permitem, por um lado, eliminar o efeito do pH, do tempo e da temperatura usado no estágio X (e a lavagem subsequente) e, por outro, averiguar a poupança em dióxido de cloro.

Todos os ensaios foram feitos em duplicado pelo que os resultados apresentados correspondem aos valores médios. Os resultados obtidos nesta secção podem ser consultados detalhadamente no Anexo II.2. É de salientar que a margem de erro para o ensaio de IK é de 0,5 unidades e para o ensaio de viscosidade é de 50 unidades.

- **Ensaio para pH 10:**

Os resultados obtidos nos ensaios onde se usou um pH 10 no estágio enzimático são apresentados na Tabela 5.2. Para este pH foram realizados dois ensaios com diferentes cargas de enzima, tendo-se obtido uma maior brancura final para o ensaio com maior carga de enzima (0,2 kg/t odp). Pelo contrário, tanto o IK como a viscosidade e a reversão de brancura da pasta não sofreram alterações significativas. Uma análise mais completa dos valores da brancura, permite concluir que:

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

i) a utilização de uma carga de enzima de 0,134 kg/t odp, mesmo a pH 10, permite obter pastas OXDE com maior brancura do que o ensaio de controlo (80,9 vs 80,1) usando a mesma carga de dióxido (1,2 % odp como Cl₂ ativo);

ii) a utilização de uma carga de enzima de 0,2 kg/t odp permite obter pastas OXDE com brancura semelhante ao do ensaio de controlo (81,1 vs 81,3) usando uma carga de dióxido 20% menor.

Tabela 5-2. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 10*.

Ensaio	Dose de enzima kg/t odp	Cl ₂ (% odp)	IK	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	PC number
LX7DE	0,2	1,2	3,7	870	81,1	1,0
LX6DE	0,134	1,2	3,7	855	80,9	1,0
LC6DE	0	1,2	3,7	874	80,1	1,1
LC6'DE	0	1,5	3,6	849	81,3	0,9

*Restantes condições: consultar Tabela 4.1.

Quando se comparam os resultados apresentados na Tabela 5-2 com os obtidos na Figura 5.1, pode inferir-se ainda que as condições usadas no estágio X, e que são replicadas nos ensaios de controlo, permitem reduzir o valor do *PC number* (de 1,4 a 1,6 para 0,9 a 1,1), muito provavelmente por haver solubilização (a pH 10 e a 88°C) de alguns grupos potencialmente cromóforos que fazem estabilizar a brancura das pastas.

O aumento da brancura com a utilização de cargas crescentes de dióxido de cloro nos ensaios de controlo está em concordância com os resultados apresentados anteriormente na Figura 5.1 pois maior será a remoção de grupos cromóforos.

- **Ensaio para pH 9,5:**

Os ensaios a pH 9,5 foram realizados nas mesmas condições descritas para pH 10 de modo a verificar qual a interferência do pH na atuação da enzima. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.3. A sua análise permite retirar comentários e conclusões semelhantes às descritas acima, embora se note aqui alguma variação no grau de deslenhificação nas pastas de controlo com a alteração na carga de dióxido (3,1 vs 3,5).

Tabela 5-3. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 9,5*.

Ensaio	Dose de enzima kg/t odp	Cl ₂ (% odp)	IK	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	PC number
LX4DE	0,2	1,2	3,3	866	81,2	0,9
LX5DE	0,134	1,2	3,6	869	79,6	1,0
LC4DE	0	1,2	3,5	851	80,0	1,0
LC4'DE	0	1,5	3,1	855	81,6	0,8

*Restantes condições: consultar Tabela 4.1.

- **Ensaio para pH 9:**

O desempenho da xilanase X a pH 9 está mostrado na Tabela 5.4. Nestas condições, observa-se uma melhor atuação da xilanase X, sendo mais patente o seu efeito na diminuição do IK nas pastas OXDE quando comparadas com as pastas de controlo para a mesma carga de dióxido de cloro. A sua ação na estabilidade da brancura (através do *PC number*) também é perceptível, concluindo-se que a enzima remove parte dos grupos responsáveis pela reversão de brancura das pastas. A xilanase, através da sua ação hidrolítica nas xilanas potencia a remoção dos ácidos hexenurónicos (um dos grupos considerados responsáveis pela reversão de brancura) e de estruturas LCC (Loureiro, 2012).

Tabela 5-4. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 9*.

Ensaio	Dose de enzima kg/t odp	Cl ₂ (% odp)	IK	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	PC number
LX3DE	0,2	1,2	3,0	850	82,8	0,6
LX2DE	0,134	1,2	3,1	856	82,4	0,6
LX1DE	0,067	1,2	3,1	849	81,5	0,7
LC1DE	0	1,2	3,7	814	80,0	1,0
LC1'DE	0	1,5	3,2	847	81,6	0,8

*Restantes condições: consultar Tabela 4.1.

Para este valor de pH, e usando uma carga de dióxido de cloro 20% menor, basta uma carga enzimática de 0,067 kg/t odp para se obter um nível de brancura igual à pasta de controlo: 81,5% de brancura ISO para uma carga de 1,2% Cl₂ no ensaio enzimático LX1DE e 81,6 % ISO para uma carga de 1,5% Cl₂ no ensaio de controlo LC1'DE. Usando maiores doses de enzima, as brancuras das pastas OXDE são superiores às da pasta de controlo quando esta é branqueada com uma carga de 1,5% Cl₂.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

- **Ensaio para pH 8:**

Os resultados do conjunto de ensaios realizado a pH 8 podem ser observados na Tabela 5.5.

Tabela 5-5. Resultados obtidos para os ensaios com xilanase X realizados a pH 8*.

Ensaio	Dose de enzima kg/t odp	Cl₂ (% odp)	IK	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	PC number
LX9DE	0,2	1,2	2,7	817	83,6	0,6
LX8DE	0,067	1,2	3,1	829	82,6	0,8
LC8DE	0	1,2	3,9	817	78,8	1,2
LC8'DE	0	1,5	3,8	824	79,6	1,1

*Restantes condições: consultar Tabela 4.1.

Analisando os resultados obtidos, facilmente se conclui que com a diminuição do pH a enzima potencia a sua atuação, sendo que, para pH 8, se obtêm os melhores resultados em termos de brancura, reversão de brancura e IK. Estes resultados indiciam que a enzima está a potenciar a remoção de: i) lenhina (diminuição do IK), ii) cromóforos (aumento de brancura) e iii) grupos responsáveis pela reversão (aumento da estabilidade dado pela redução do *PC number*). A utilização da dose de enzima mais baixa permite atingir brancuras bastante superiores às pastas de controlo, pelo que a necessidade de utilização de dióxido de cloro é substancialmente reduzida.

Apesar de ser referido na literatura (Pedrazzi, 2011) que a remoção de parte das xilanas, deixa as cadeias de celulose mais desprotegidas e mais vulneráveis ao efeito dos reagentes químicos oxidantes utilizados no branqueamento, não é notório este efeito, dado que a viscosidade se mantém praticamente constante. Por outro lado, a remoção de xilana (de menor peso molecular do que a celulose, e menos abundante) poderá levar a um aumento da propriedade viscosidade. Tendo estes dois efeitos sentidos opostos, o facto desta propriedade se manter não permite tirar conclusões em absoluto sobre o efeito da xilanase na degradação da celulose.

5.3.1. Ganho de brancura

O ganho de brancura conseguido com o auxílio da xilanase X é um fator bastante importante para a sua possível implementação a nível industrial. Por isso, foi elaborada a Figura 5.4 para uma maior sistematização e visualização da informação já apresentada, tendo por base a brancura da pasta original (P1).

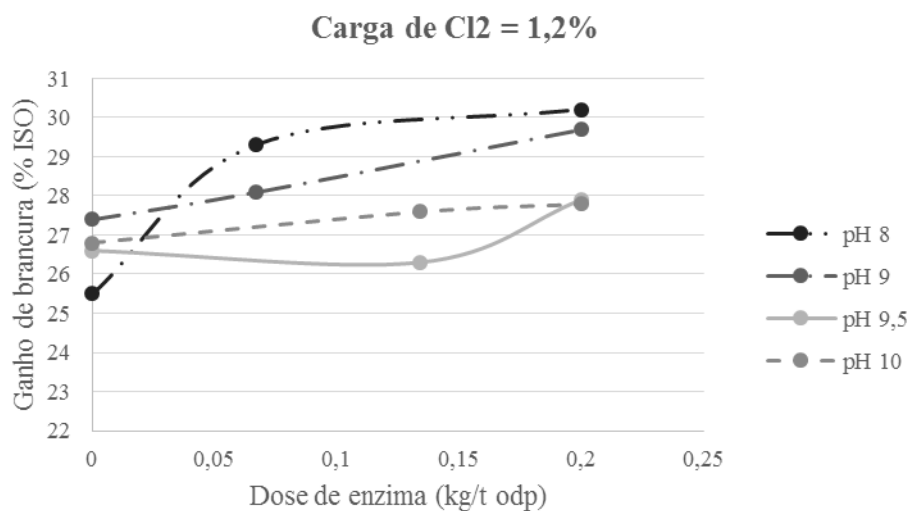


Figura 5.4. Ganho de brancura obtido através do tratamento enzimático aplicado à pasta P1.

Através da análise da Figura 5.4 pode verificar-se que para todos os ensaios realizados se conseguiu um ganho de brancura relativamente à pasta inicial (P1) superior a 25 pontos. Para a carga mais elevada, o efeito da diminuição de pH de 9 para 8 no ganho de brancura é muito menor (os valores estão apenas distanciados em cerca de uma unidade) do que a diminuição de pH de 9 para 10.

A brancura máxima atingida é de ~30 pontos relativamente à pasta inicial (P1), e é observada para pH 8, o que comprova mais uma vez que a enzima apresenta melhor desempenho para este valor de pH.

Pode-se concluir que o efeito de *bleach boosting* diminui com o aumento de pH e aumenta com o aumento da carga enzimática.

5.4. Poupança de reagentes

A poupança de dióxido de cloro que seria possível obter através da implementação de um estágio com a xilanase X era o principal objetivo deste estudo. De seguida é explicada a metodologia adotada para esta quantificação, usando os resultados para pH 8 – Figura 5.5. O Anexo II.9 apresenta os gráficos para os restantes valores de pH.

Na Figura 5.5 é apresentada uma linha designada por controlo, que mostra a evolução da brancura da pasta tendo por base dois pontos reais, um que corresponde a uma carga de cloro ativo de 1,2 (% odp) e outro que corresponde a uma carga de cloro ativo de 1,5 (% odp). As restantes condições foram iguais às condições utilizadas na sequência OXDE mas em que a enzima no ensaio X foi substituída por uma solução tampão (sem enzima). A equação desta linha “controlo” foi obtida por regressão linear: $y=2,6667x+75,6$. As linhas horizontais (designadas abaixo por “target”) correspondem à brancura da pasta depois de lhe ter sido aplicada a sequência OXDE, com doses variáveis de enzima (0,067 e 0,2 kg/t odp), e igual carga de dióxido de cloro (1,2 % odp, que é designada abaixo “carga de ClO₂ estágio”).

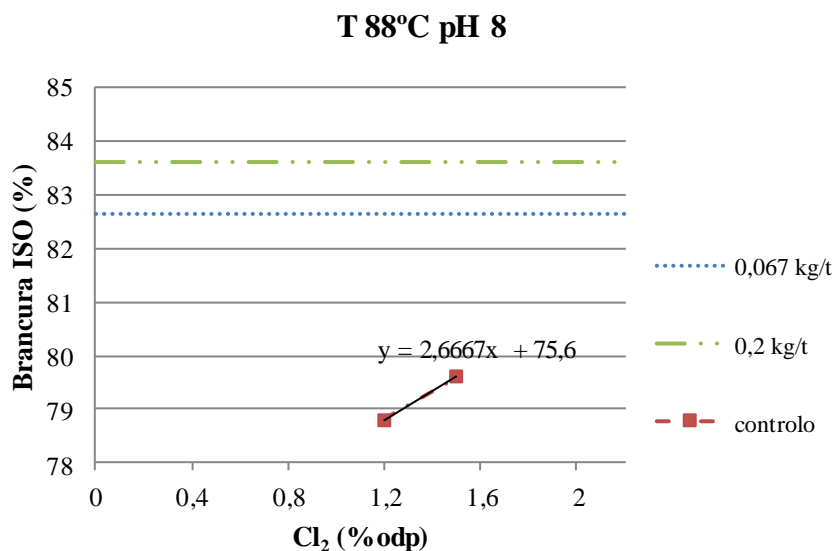


Figura 5.5. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO₂, a pH 8.

Conhecida a equação da reta de controlo, pode-se obter uma estimativa (por interpolação ou por extrapolação, consoante os casos) da carga de dióxido de cloro que seria necessária para atingir a brancura definida pelas linhas horizontais. Este valor estimado é aqui

designado por carga de ClO₂ para o controlo. O cálculo da poupança de ClO₂ foi então obtido através da equação 13.

$$\text{Poupança de ClO}_2 \% = \frac{\text{Carga ClO}_2 \text{ para o controlo} - \text{Carga de ClO}_2 \text{ estágio}}{\text{Carga ClO}_2 \text{ para o controlo}} \times 100 \quad \text{Eq.13}$$

Para pH 8 e para a menor carga de enzima (0,067 kg/t odp) a estimativa da carga de ClO₂ para o controlo foi 2,64 %, neste caso por extrapolação da linha “controlo” até intercectar a linha horizontal que define a brancura da pasta quando se usou uma carga enzimática de 0,067 kg/t odp. A poupança de reagente foi estimada em:

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,64 - 1,2}{2,64} = 55\%$$

Uma vez que a brancura tende para um patamar com o aumento da carga de dióxido de cloro, de acordo com o observado na Figura 5.1, esta estimativa é por defeito.

Na Tabela 5.6 são apresentadas as poupanças de reagente estimadas para todos os ensaios realizados.

Tabela 5-6. Poupança de reagente ClO₂ obtida para todos os ensaios realizados.

pH	Carga de enzima	target	Poupança %
10	0,2	81,1	17
	0,134	80,9	15
9,5	0,2	82,2	16
	0,134	79,6	~0
9	0,2	82,8	31
	0,134	82,4	28
	0,067	81,5	19
8	0,2	83,6	60
	0,067	82,6	55

Através da análise da Tabela 5.6, é possível verificar que as poupanças de reagente não são industrialmente atrativas para os ensaios realizados com a xilanase X a pH 9,5 e 10. Mesmo usando cargas enzimáticas elevadas (0,2 kg/t odp), as poupanças não ultrapassam 17%. Contudo, para os outros dois valores de pH, obtém-se valores bastante promissores de redução de dióxido de cloro. Para pH 9, é possível obter cerca de 30 % de redução da

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

quantidade de ClO₂ quando é utilizada uma carga de enzima de 0,134 kg/t odp ou superior, o que torna a xilanase X bastante promissora no mercado industrial. Para pH 8 atingem-se valores bastante elevados de poupança, 55%, mesmo para a carga enzimática mais baixa (0,067 kg/t).

5.5. Rendimentos

Como referido anteriormente, o tratamento enzimático apresenta como desvantagem a perda de rendimento em pasta devido, nomeadamente, à degradação/solubilização de parte da xilana. Se for demasiado elevada pode colocar em causa todas as vantagens que advêm deste tratamento. Por esta razão foram realizados ensaios para avaliar o efeito da ação da xilanase X no rendimento. Os resultados são apresentados detalhadamente no Anexo II.3, e sucintamente na Tabela 5.7.

Tabela 5-7. Rendimento após aplicação de xilanase X na pasta P2.

	Ensaio	Dose enzima (kg/t odp)	pH	Rendimento %	Perda de rendimento %
XDE	Ensaio XDE	0,134	9	95,1	2,3
	Controlo DE	0		97,4	
X	Ensaio X	0,134	9	97,8	2,2
	Controlo	0		100	
	Ensaio X	0,067	10	99,0	1,0
	Ensaio X	0,134		100	
Controlo	0	100	0		

Pode verificar-se na Tabela 5.7 que não existe perda de pasta quando se usa o tratamento enzimático num pH mais elevado (pH 10). Para pH 9, o melhor resultado obtido foi para a menor concentração de enzima, apesar desta ser suficiente para possibilitar uma poupança de dióxido de cloro cerca de 20%. A determinação do rendimento no final da sequência de branqueamento XDE, quando comparado com o estágio X isolado, usando o mesmo valor de pH, permitiu observar que não há uma alteração significativa (2,2 % vs 2,3 %), pelo que a xilanase não potencia a degradação da pasta nos estágios subsequentes.

5.6. Caracterização das Pastas

5.6.1. Determinação da Lenhina

Para tentar corroborar os resultados obtidos na determinação de IK e de HexA e discutidos na secção anterior, foi determinada a quantidade de lenhina residual presente nas pastas. A lenhina total (base pasta final) é determinada através da soma da lenhina Klason (insolúvel) com a lenhina solúvel (ASL), sendo posteriormente corrigida com o rendimento para converter o resultado na base pasta inicial. Os resultados obtidos são apresentados resumidamente na Tabela 5.8 e no Anexo II.6 é possível consultar todos os detalhes relativos aos mesmos.

Tabela 5-8. Lenhina de Klason (KL) e lenhina solúvel (ASL) das pastas obtidas antes e após o tratamento enzimático - sequência OX.

Ensaio	pH	Dose de enzima kg/t odp	KL (%)	ASL (%)	Lenhina total (base pasta inicial %)
P2	-	0	0,61	0,88	1,49
Rend X1	9	0,134	0,50	0,56	1,04
Rend X2					
Rend C1					
Rend C2	8	0	0,41	0,64	1,01
Rend X7					
Rend X8					
Rend C7					
Rend C8			0,37	0,74	1,11

Pela análise dos resultados, podemos observar que é maior a quantidade de lenhina que é suscetível de ser dissolvida (ASL) durante a hidrólise da pasta com ácido sulfúrico do que a quantidade de lenhina Klason (insolúvel). A remoção de lenhina ocorre mesmo nos ensaios de controlo a qual é potenciada pela ação enzimática. Apesar destes resultados irem no mesmo sentido que os obtidos por outras metodologias, é de salientar que a estas determinações estão associados erros relativos muito elevados dado a grandeza destes valores.

5.6.2. Determinação dos ácidos hexenurónicos

Os ácidos hexenurónicos (HexA), para além de poder interferir na estabilidade da brancura, também formam compostos organoclorados durante um estágio com dióxido de cloro (Sêco, 2006). Por estes motivos, a sua remoção prévia é bastante desejada.

A Tabela 5.9 apresenta os resultados obtidos nesta quantificação estando mais detalhados no Anexo II.5. Todos os ensaios, quando comparados com a pasta original, pasta P2 (à exceção do ensaio de controlo para pH 8), apresentam uma diminuição do teor de HexA. Tal facto pode ser explicado por estes estarem ligados às frações solubilizadas dos xilooligossacarídeos. Através da análise da Tabela 5.9, é possível verificar que para pH 8, se obtém uma maior redução do teor de HexA como consequência da utilização de enzima.

Tabela 5-9. Ácidos hexenurónicos antes e após aplicação da xilanase.

Ensaio	pH	Dose enzima (kg/t odp)	HexA (mmol/kg)	Diminuição de HexA em relação a P2 (%)	IK	IK(HexA) *	IK corr **
P2	-	-	51,9	-	11,7	4,7	7,0
Rend X1	9	0,134	48,0	7,5	10,0	4,3	5,7
Rend X2							
Rend X5		0,067	51,4	1,0	-	4,6	-
Rend X6							
Rend C1	8	0	51,4	0,9	11,0	4,6	6,4
Rend C2							
Rend X7		0,2	46,6	10,3	9,0	4,2	4,8
Rend X8							
Rend C7	0	52,4	-1,0	10,9	4,7	6,2	
Rend C8							

*IK(HexA)=0,09*HexA; **IK corr=IK-IK(HexA)

A informação do teor de HexA nas pastas permitiu ainda fazer uma estimativa da sua contribuição para o índice kappa e corrigir este valor. Os HexA contribuem para o IK, uma vez que consomem permanganato de potássio usado nessa determinação, podendo essa contribuição atingir 50% em pastas de folhosas (Pedroso e Carvalho, 2003). Uma unidade de IK é equivalente a aproximadamente 11 µmol de HexA. Os dados apresentados na Tabela 5.9 foram determinados com base na equação 14 desenvolvida por Pedroso e Carvalho (2003) para pastas *kraft* de *E. globulus* nacional, onde LT é a lenhina total residual na pasta. Esta

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

$$IK = 5,6 \times LT + 0,09 \times HexA \quad \text{Eq. 14}$$

Na Tabela 5.9 é possível verificar que o teor de HexA contribui com 40% para o valor do IK numa pasta pré-deslenhificada com oxigénio. Este valor deve-se ao facto do Oxigénio molecular não reagir com estes grupos, embora seja um agente deslenhificador. Subtraindo ao valor de IK, a contribuição dos HexA, obtém-se o IK corrigido que será proporcional ao teor de lenhina residual. Como se pode ver, os ensaios de controlo permitem remover lenhina equivalente a 0,6 e 0,8 unidades de IK. Adicionalmente, a ação enzimática permite baixar substancialmente este valor, pelo que há concordância entre estes resultados e os obtidos através da análise das absorvâncias dos filtrados a 205 nm. Por este motivo, a contribuição dos HexA para o IK aumenta para 47% quando se aplica uma carga enzimática de 0,2 kg/t odp no pH 8 apesar de haver remoção de HexA.

5.6.3. Teor de Pentosanas

Como referido anteriormente na secção introdutória, as hemiceluloses contribuem de forma significativa para a melhoria das propriedades físico-mecânicas das fibras, pelo que a sua perda durante o processo de cozimento e posteriormente nos processos de branqueamento é indesejável. Além disso, contribuem para o rendimento em pasta já que o principal objetivo do processo de cozimento é a deslenhificação. O teor de pentosanas foi determinado em pastas com as condições de tratamento enzimático que permitissem maior variação nos resultados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5-10. É possível consultar os resultados mais detalhados no Anexo II.8.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Tabela 5-10. Teor de pentosanas obtido antes e após estágio com xilanase X.

Ensaio	pH	dose enzima kg/t odp	Pentosanas (%)	Perda de pentosanas *	Perda de rendimento *
P2	-		18,6	-	-
Rend X1	9	0,134	17,9	0,7	2
Rend X2					
Rend C1	8	0	18,6	3	3
Rend C2					
Rend X7	8	0,2	15,8	3	3
Rend X8					
Rend C7	8	0	18,8	3	3
Rend C8					

*em relação ao controlo

Os valores obtidos para os ensaios de controlo e para a pasta original estão situados entre 18,6 e 18,8%. Após a ação enzimática, estes valores descem significativamente principalmente para pH 8 e carga elevada de enzima. Curiosamente, nestas condições, a perda de rendimento em pasta com a aplicação da enzima é semelhante à diminuição do teor de pentosanas.

5.7. Caracterização dos filtrados

5.7.1. Análise dos Filtrados por Espectroscopia UV

Com o intuito de verificar, no imediato, a ação da enzima na deslenhificação das pastas, foi utilizada a espectrofotometria UV para medir a absorvância dos filtrados obtidos após o ensaio enzimático, num comprimento de onda de 205 nm, que é o comprimento de onda característico para a lenhina solúvel (TAPPI T222). Os resultados são apresentados na Figura 5.6. Os dados detalhados podem ser consultados no Anexo II.4.

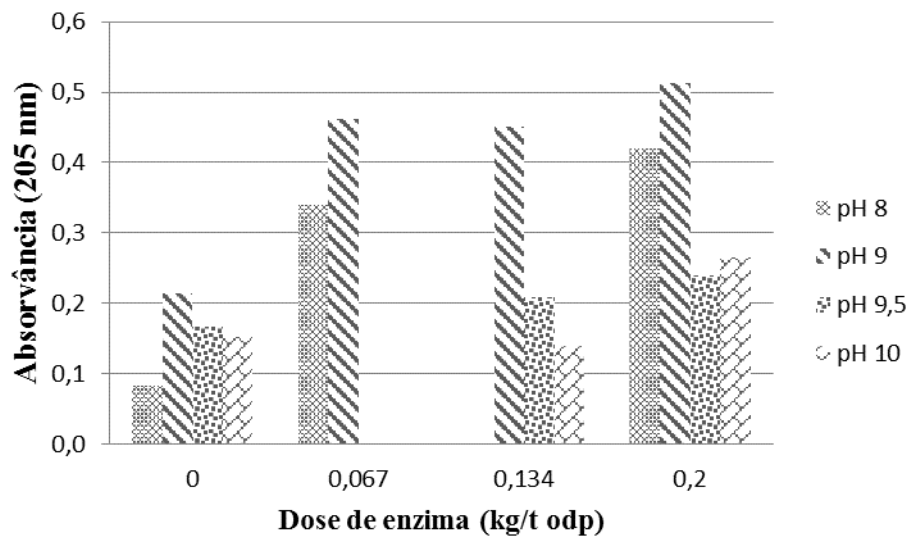


Figura 5.6. Representação da absorvância do filtrado, medida a 205 nm para as diferentes cargas de enzima.

Através da análise da Figura 5.6 podemos verificar que a dose de enzima utilizada no ensaio tem muita influência na remoção de lenhina, sendo a dose maior (0,2 kg/t odp) a que apresenta melhores resultados. Relativamente ao pH, é possível verificar que a pH 10 e pH 9,5 é onde a enzima apresenta menor eficiência. O aumento na absorvância a pH 8 e 9 são semelhantes quando se comparam os ensaios realizados com diferentes doses de enzima e o respetivo controlo.

Comparando todos os controlos, ou seja, todos os ensaios onde não existe a presença de enzima, é possível verificar que existe remoção de lenhina (aumento de absorvância) apenas com o aumento do pH e a lavagem subsequente.

5.7.2. Açúcares redutores pelo método DNS

O grupo carbonilo livre dos monossacarídeos é suscetível de ser oxidado a ácido carboxílico, reduzindo os agentes oxidantes. Por isso, são potencialmente açúcares redutores. O método do ácido dinitrossalicílico (DNS) é comumente utilizado para estimar a concentração de açúcares redutores em hidrolisados enzimáticos, tornando-se uma alternativa a métodos mais complexos e demorados como os métodos cromatográficos, HPLC ou GC. Também é frequentemente utilizado para determinar atividades enzimáticas (Núñez et al., 2012).

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

A cor amarelo-acastanhada produzida é avaliada pelo valor da absorvância a 540 nm que é proporcional à concentração do açúcar redutor. É necessário construir uma curva de calibração usando um monossacarídeo comercial de elevada pureza, sendo os resultados expressos em equivalentes desse açúcar. Neste trabalho foram construídas 3 curvas de calibração usando xilose (uma por cada solução de DNS preparada, sempre que a anterior terminava) - Anexo II.7.1.

O objetivo da aplicação deste método nos filtrados dos ensaios com xilanase era avaliar a ação degradativa desta enzima na pasta, através da produção de açúcares simples (dissolvidos na fase líquida). Dado que se poderiam também libertar oligossacarídeos, nomeadamente xilooligossacarídeos, tentou-se usar uma enzima que, aplicada nos filtrados após tratamento enzimático com xilanase X, os hidrolisasse. De facto, foi usada uma beta-xilosidase (BX) para transformar açúcares de maior peso molecular (não redutores) presentes nos filtrados em monossacarídeos (redutores). O fator de diluição foi de 10. A curva de calibração utilizada nestes ensaios foi a curva de calibração 1 (Anexo II.7.1). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.11. O branco utilizado na medição de todas as amostras foi constituído por DNS, solução tampão e o respetivo controlo (iguais condições operatórias mas sem enzima).

Tabela 5-11. Equivalentes de xilose antes e após O tratamento dos filtrados dos estágios X com uma beta-xilosidase (BX).

Amostra de Pasta P1	pH	Dose enzima (kg/t odp)	Antes de BX		Depois de BX	
			Xilose mg/mL	Xilose %*	Xilose mg/mL	Xilose %*
LX4	9,5	0,2	0,02	0,02	0,023	0,02
LX3	9	0,2	0,23	0,21	ABS<0	-
LX9	8	0,2	0,64	0,58	ABS<0	-

*Porcentagem de xilose que foi removida e que se encontra nos 180 g de filtrado. Esta percentagem é determinada da seguinte forma: temos 180 g de filtrado e 20 g de pasta em base seca em cada ensaio realizado. Por exemplo, para LX9 temos: $0,64 \times 180 = 115,2$ g (0,1152 mg) de xilose no filtrado, ou seja, $(0,1152/20) \times 100 = 0,58\%$.

Através da observação da Tabela 5.11, é possível verificar que a beta-xilosidase não atuou como previsto. No entanto, apenas com a análise dos resultados obtidos nos filtrados (tal qual) pode-se confirmar a maior atividade da xilanase X a pH 8, dado que o teor de xilose libertada para o filtrado aumenta significativamente com a diminuição do pH de 9,5 para 8.

Na tentativa de degradar os xilooligossacarídeos potencialmente existentes nos filtrados obtidos após os estágios X, e uma vez que não se obteve resultados aceitáveis com a beta-xilosidase, usou-se a xilanase X no próprio filtrado como hidrólise adicional (88°C, pH 8, 2 h) – Figura 5.7. O fator de diluição nestes ensaios foi de 1,316. A curva de calibração utilizada nestes ensaios foi a curva de calibração 1 (Anexo II.7.1). Os resultados estão apresentados na Tabela 5-12 onde se pode mais uma vez confirmar a liberação de açúcares redutores nos filtrados por ação da xilanase X na pasta O. Esta liberação aumenta para pH decrescente e para dose de enzima crescente. No entanto, depois de fazer um segundo tratamento com xilanase X, agora no filtrado resultante do 1º tratamento, verifica-se alguma inconsistência nos valores obtidos: um dos resultados obtidos no segundo filtrado (depois de um novo tratamento enzimático) é inferior aos obtidos depois do primeiro filtrado.

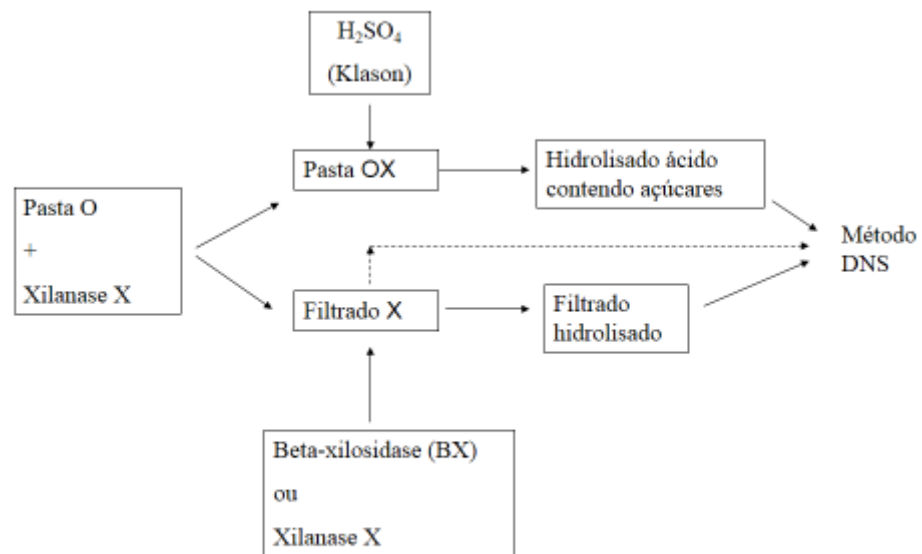


Figura 5.7. Esquema experimental aplicado nalguns ensaios para avaliar a liberação de açúcares produzida pela Xilanase X na sua ação sobre as pastas O.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

Tabela 5-12. Concentração de xilose presente no filtrado obtido após tratamento enzimático da pasta O: filtrado “tal e qual” e filtrado resultante de novo tratamento do filtrado “tal qual” com xilanase X.

Ensaio com pasta P2	pH	Dose enzima (kg/t odp)	Filtrado tal qual	Filtrado após 2º tratamento com Xilanase X
			Xilose mg/mL	Xilose mg/mL
Rend X9 Rend X10	10	0,134	0,02	0,09
Rend X1 Rend X2	9	0,134	0,23	0,14
Rend X7 Rend X8	8	0,2	1,05	1,07

Havendo dúvidas quanto ao desempenho da beta-xilosidase BX, face ao desempenho da xilanase X, realizaram-se os ensaios apresentados nas Tabela 5-13 e Tabela 5-14. Foram utilizados dois substratos distintos, as xilanas comerciais de *oat spelts* (arabinoglucuronoxilana) e de *beechwood* (glucuronoxilana). As duas xilanas diferem entre si pela presença de um resíduo lateral de arabinose na primeira, sendo a segunda idêntica à xilana de *E. globulus*. O fator de diluição utilizado para os ensaios intitulados de “depois de BX” foi de 10. A curva de calibração utilizada para estes ensaios foi a curva de calibração 3 (Anexo II.7.1). As condições do ensaio foram pH 5, 50°C, 2h, depois do qual se usou o líquido resultante após filtração.

Tabela 5-13. Xilose nos filtrados provenientes da aplicação da beta-xilosidase BX em xilana de *oat spelts* e em xilana de *beechwood*.

Xilana	Antes BX		Depois de BX	
	Abs	Xilose mg/mL	Abs	Xilose mg/mL
xilana <i>oat spelts</i> (filtrada)	0,012	-0,017	0,013	-0,086
xilana <i>beechwood</i> (filtrada)	0,024	0,051	0,013	-0,086

Os resultados obtidos indicam que a beta-xilosidase BX não hidrolisa nenhuma das xilanas, possivelmente por não existirem xilooligossacarídeos de baixo peso molecular. Noutros ensaios, aplicou-se a xilanase X sobre os mesmos substratos (88°C, pH 8, 1h) para

esta poder libertar mono e oligossacarídeos e assim poder ser visível a atuação da beta-xilosidase. Os resultados são apresentados na Tabela 5-14. Mais uma vez, o fator de diluição utilizado nos ensaios de “depois de BX” foi de 10 e o fator de diluição utilizado nos ensaios “antes de BX” foi de 3,889.

Tabela 5-14. Xilose nos filtrados provenientes da aplicação da beta-xilosidase BX em amostras líquidas contendo os hidrolisados enzimáticos de xilana de *oat spelts* e de xilana de *beechwood*.

Xilana + Xilanase	Antes BX		Depois de BX	
	Abs	Xilose mg/mL	Abs	Xilose mg/mL
xilana oat spelts +Xilanase X	0,140	2,637	0,017	0,113
xilana beechwood + Xilanase X	0,137	2,585	0,012	-0,122

Mais uma vez os resultados obtidos indicam que a beta-xilosidase BX não está a desempenhar as suas funções. Foram feitos outros ensaios, variando as condições operatórias de hidrólise enzimática das xilanas para verificar se isso alteraria a composição dos hidrolisados e se afetaria a atuação da beta-xilosidase. Os resultados foram novamente negativos. Tendo sido esgotadas todas as alternativas possíveis, conclui-se então que a beta-xilosidase BX estaria inativa possivelmente devido ao transporte desde o fornecedor até ao DEQ. Só seria possível retirar todas as dúvidas realizando novos ensaios com stock renovado, mas o tempo para este trabalho estava praticamente esgotado.

5.7.3. Açúcares por HPLC

Para se obter uma quantificação de açúcares mais detalhada nos filtrados, recorreu-se ao método de HPLC, que permite distinguir os monossacarídeos entre si. Para tal é necessário conhecer os tempos de retenção de cada um, injetando uma solução contendo cada um dos açúcares, individualmente Tabela 5.15. Além disso são necessárias curvas de calibração para cada um dos açúcares a quantificar. Foram realizados os seguintes ensaios: i) análise do filtrado tal qual estava depois do estágio X; ii) análise do filtrado proveniente de uma segunda

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

hidrólise aplicada ao filtrado referido em i), com adição de xilanase X durante uma hora a pH 8 e temperatura de 88°C.

Tabela 5-15. Tempos de retenção correspondentes a cada açúcar.

Açúcar	Tempos de retenção (min)
celobiose	11,16
glucose	13,293
xilose	14,477
galactose	14,747
manose	15,107
arabinose	16,807

Os resultados obtidos são apresentados resumidamente na Tabela 5.16 e detalhadamente no Anexo II.7.2. Podemos observar que apenas foram detetados xilose e galactose, sendo maior a quantidade de xilose. A xilanase X aplicada na pasta (estágio X) leva à hidrólise de hidratos de carbono existentes na pasta, resultando na solubilização de xilose e/ou galactose nos filtrados. Esta degradação é potenciada por cargas crescentes de enzima e pela diminuição do pH. Quando uma amostra deste filtrado é sujeita a uma hidrólise enzimática com a mesma xilanase X, há um acréscimo de produção de xilose e/ou galactose, comprovando que houve também solubilização de oligossacarídeos durante o estágio X.

Tabela 5-16. Açúcares detetados por HPLC nos filtrados dos estágios X e nos filtrados sujeitos a uma 2ª hidrólise.

Ensaio	pH	dose enzima (kg/t odp)	% libertada no branqueamento		% libertada após a adição de xilanase X a pH8, 88°C, 1h		% açúcares libertados (total)
			Xilose	Galactose	Xilose	Galactose	
LX7	10	0,2	0	0,037	0	-	0,04
LX6		0,134	0	0,013	0	-	0,01
LX4	9,5	0,2	0,552	-	0,062	0,028	0,64
LX5		0,134	0	0,029	0	0,040	0,07
LX1	9	0,067	0	0,020	0	-	0,02
LX9	8	0,2	0,409	0,051	0,326	0,018	0,80
LX8		0,067	0	0,030	0	0,014	0,04

6. CONCLUSÕES

A aplicação de um tratamento enzimático com xilanases (estágio X) no branqueamento de pastas *kraft* de *E. globulus* torna-se numa vantagem para o processo, uma vez que impulsiona o *bleach boosting*.

O efeito do tratamento enzimático foi analisado numa pasta pré-deslenhificada com oxigénio, o que permitiu obter a sequência OXDE. Dentro da gama de pH estudada (8 a 10) a xilanase X fornecida pela Novozimes A/S, desempenha melhor as suas funções para o pH mais baixo, permitindo atingir ganhos de brancura ISO de 29,3 % para a menor carga de enzima (0,067 kg/t odp), quando comparada com a pasta original. A análise do *PC number* permitiu concluir que nestas condições a pasta apresenta uma maior estabilidade de brancura ISO. A aplicação desta xilanase X, nas condições de melhor desempenho (pH 8 e 88°C), permite obter poupança de ClO₂ superior a 50% para a menor carga de enzima estudada, pelo que se pode concluir que esta xilanase é bastante promissora no efeito de *bleach boosting*. Esta poupança diminui quando se aumenta o pH ou se diminui a carga enzimática.

Em sentido contrário, variou o rendimento em pasta, como seria de esperar, variando entre ~0% para pH 10 e 3,3% para pH 8.

A caracterização química das pastas envolveu a determinação do índice kappa (IK), da viscosidade, do teor de pentosanas, de lenhina e de ácidos hexenurónicos. A caracterização química dos filtrados obtidos após o tratamento enzimático incluiu a determinação da lenhina e dos açúcares solubilizados por técnicas como espectroscopia UV, método DNS (açúcares redutores) e HPLC. Esta caracterização química das pastas e dos filtrados permitiu avaliar a ação da xilanase sobre a pasta.

A xilanase hidrolisa a xilana, levando à solubilização de i) monossacarídeos como xilose e/ou galactose; ii) oligossacarídeos contendo estes açúcares; iii) lenhina, provavelmente ligada às porções de xilana dissolvida (LCC); ácidos hexenurónicos associados aos xilo-oligossacarídeos. Por isso, o teor de ácidos hexenurónicos diminuiu sendo a sua remoção tanto maior quanto menor for o pH e maior for a carga de enzima. O teor de pentosanas também diminuiu devido à hidrólise da xilana. Como o IK da pasta é afetado tanto pela presença de lenhina como pelos ácidos hexenurónicos, a redução do seu valor deveu-se à

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

remoção simultânea de ambos os componentes. O tratamento enzimático não provoca alterações significativas na viscosidade, indiciando não haver degradação da celulose

Para os ensaios da sequência OXDE em que foram analisados os filtrados através de espectroscopia UV, a 205 nm, verificou-se que ocorreu remoção da lenhina residual da pasta, tendo esta sido dissolvida. Esta remoção foi possível confirmar através da determinação da lenhina residual na pasta tratada (contabilizando a lenhina Klason e a lenhina solúvel). A determinação dos açúcares redutores pelo método DNS não foi conclusiva, mas a deteção de monossacarídeos por HPLC revelou a presença de xilose e galactose nos filtrados. Na tentativa de converter a eventual presença de xilo-oligossacarídeos (XOS) em xilose, usou-se uma beta-xilosidase mas que mostrou não estar ativa. Por escassez de tempo, usou-se em alternativa a xilanase X para provocar a hidrólise mais completa dos XOS existentes nos filtrados. Os monossacarídeos produzidos foram em menor quantidade do que o teor existente no filtrado inicial, indiciando que a ação da xilanase X na pasta provoca a libertação de xilose em maior quantidade do que de XOS.

6.1. Perspetivas de trabalho futuro

Por falta de tempo não foi possível realizar todos os ensaios desejados. Pelo que futuramente poderão ser alvo de interesse os seguintes pontos:

- Analisar o comportamento da xilanase X noutras pastas *kraft* de Eucalipto, nomeadamente em pastas sem o estágio prévio de pré-deslenhificação com oxigénio (estágio O);
- Avaliar as propriedades papelarias resultantes;
- Avaliar o desempenho de uma outra beta-xilosidase para melhor averiguar a relação entre xilo-oligossacarídeos e xilose solubilizados nos filtrados.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, S.; Riaz, S.; Jamil, A. (2009) *Molecular cloning of fungal xylanases : na overview* Springer. 10.1007/s00253-009-2079-4.
- Azevedo, M. A. B. (2011) *Diferentes Processos de Branqueamento da Celulose e seu Efeitos nas Propriedades Físicas e Cristalinidade*. Tese de Doutorado em Ciências – Químicas. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Bajpai, P. (1999) *Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry*. India: Biotechnol. Prog 15, 147-157
- Bajpai, Dr. P. (2005) “Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching”. *Volume 1*. India: Elsevier.
- Bajpai, P. (2012) *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. India: Springer.
- Baptista, C. M. C. (2006) *Influencia das Condições de Cozimento sobre a Estrutura da Lenhina e a Branqueabilidade da Pasta Kraft de Pinus pinaster*. Tese de Doutorado em Química. Universidade da Beira Interior.
- Biermann, C. J. 1996. *Handbook of Pulping and papermaking*. Second Edition. San Diego, California : Academic press.
- Bissoon, S.; Christov, L.; Singh, S. (2002) “Bleach boosting effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp.” *Process Biochemistry* 37 (2002) 567–572.
- Boucher, J.; Chirat, C.; Lachenal, D.; (2014) *Extraction of hemicelluloses from wood in pulp biorefinery, and subsequent fermentation into ethanol*. *Energy Conversion and Management* 88 (2014) 1120–1126.
- Carreira, H. J. M. (2009) “Redução de grupos cromóforos responsáveis pela cor da pasta kraft”. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade de Aveiro.
- Carvalho, M.G.V.S. (1999) *Efeito das Variáveis de Cozimento nas Características Químicas de Pastas Kraft de Eucalyptus globulus*. Tese de Doutorado em Engenharia Química especialidade de Processos Químicos. Universidade de Coimbra.
- Celpa, 2013. *Indústria Papeleira Portuguesa*. Boletim Estatístico. Acedido em 30-05-2015. Disponível em www.celpa.pt.
- Dean, J. F. D.; Akhtar, M; Argyropoulos, D.S.; Bajpai, P.; Bajpai, P. K.; Blanchette,

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

- R. A.; Buchert, J.; Eriksson, K.-E. L.; Guenette, M.; Hata, K.; Johnsrud, S. C.; Kirk, T. K.; Kuhal, R. C.; LaFayette, P. R.; Menachem, S. B; Merkle, A. A.; Suurnakki, A.; Tenkanen, M.; Tolan, J. S.; Viikari, L.; Wall, M. B. (1997) *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. T. Scheper (ed). Vols. Professor Dr. K.-E. L. Eriksson. Germany : Springer.
- Dyer, T. J. (2004) *Elucidating the Formation and Chemistry of Chromophores during Kraft Pulping*. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Wisconsin-Stevens Point. Atlanta, Georgia.
- Eriksson, K.-E. L. (1997) *Biotechnolgy in the Pulp and Paper Industry*. Germany : Springer.
- Esteves, B.; Domingos, I.; Lopes, L. C.; Ferreira, J.; Viana, H.; Pereira, H. (2013) *Variação transversal da composição química de árvores de Eucalyptus globulus com 15 anos de idade*. 7º Congresso Florestal Nacional: “Florestas – Conhecimento e Inovação”.
- Esteves, C. S. V. G. (2013) *Efeito da aplicação de xilanases na redução do consumo de reagentes no branqueamento de pastas kraft de eucalipto*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade de Coimbra.
- Evtuguin, D. V.; Tomas, J. L.; Silva, A. M. S.; Neto, C. P., (2003) *Characterization of na acetylated heteroxylan from Eucalyptus globulus Labill. Carbohydr. Res.*, 338 (2003), 597-604.
- Fengel, D., Wegener, G., “Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions”, (1989) Walter de Gruyter, Berlin.
- Gierer, J.S.S., (1986) *Chemistry of delignification. Part 2:Reactions of lignins during bleaching*. Wood Sci. Technol., 20, 1-33.
- Gomes, E.; Guez, M. A. U.; Martin N.; da Silva, R. (2006) *Enzimas Termoestáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial*. Quim. Nova, Vol. 30, No. 1, 136-145, 2007.
- Kim, T. H. (2013) “Pretreatment of Lignocellulosic Biomass” in Shang-Tian, Y. (ed.) *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*. Aiche Wiley, Cap. 6,108-126.
- Ko, C.-H.; Lin, Zi-P.; Tu, J.; Tsai, C.-H.; Liu, C.-C. (2009) *Xylanase production by Paenibacillus campinasensis BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching*. International Biodeterioration e Biodegradation 64 (2010) 13-19.
- Koch, G. (2006) “Raw Material for Pulp.” In Herbert Sixta. *Handbook of Pulp*. Wiley-VCH, Cap.2, 21-69.
- Kolar, J. J.; Lindgren, B. O.; Pettersson, B., (1983) *Chemical reactions in chlorine*

-
- dioxide stages of pulp bleaching*. Wood. Sci. Technol., 17(2), 117-128.
- Laine, C. (2005) *Structures of Hemicelluloses and pectins in Wood and Pulp*. Thesis for the degree of Doctor of Chemical Technology. University of Technology (Espoo, Finland).
- Loureiro, P. E. G. (2012) *On the role of xylan in the final bleaching of Eucalyptus globulus kraft pulps*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade de Coimbra.
- Loureiro, P. E. G.; Evtuguin, D. V.; Carvalho, M. G. V. S. (2011) *The final bleaching of eucalypt kraft pulps with hydrogen peroxide: relationship with industrial ECF bleaching history and cellulose degradation*. J. Chem Technol Biotechnol 86: 381-390.
- Miller, G. L. (1958) *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry.
- Nascimento, V. D. (2005) *Estudo da influência dos componentes da pasta kraft de E. globulus sobre o índice kappa e brancura*. Tese de Mestrado em Engenharia dos Processos de Produção de Pasta para Papel. Universidade de Aveiro.
- Novozymes A/S Copyright©(2010). Novozymes. All Rights Reserved – *Enzymes at Work*. Acedido em 17-02-2015. Disponível em www.novozymes.com.
- Núñez, R. A.; Pérez, B. R.; Motzezak, R. H.; Chirinos, M. (2012) *Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease*. Multiciencias. ISSN: 1317-2255.
- Oliveira, S. C. S. (2010) *Influência de um pré-tratamento ácido na branqueabilidade das pastas de E. globulus*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade de Aveiro.
- Pedrazzi, C.; Colodette, J. L.; Oliveira, R. C.; Muguët, M. C. S. (2011) *Influência do processo de polpação e do conteúdo de xilanas da polpa na branqueabilidade*. O Papel, 72(5), 37-55.
- Pedroso, A. I.; Carvalho, M. G., 2003. *Alkaline pulping of Portuguese Eucalyptus globulus: Effect on hexenuronic acid content*. J. Pulp Pap. Sci., 29(5): 150-154.
- Pinheiro, C. T. (2014) *Aplicação de xilanases em pastas kraft não branqueadas de eucalipto*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade de Coimbra
- Pinto, P. C. O. R. (2005) *Influência da estrutura química dos componentes da madeira no seu desempenho nos processos de produção de pastas celulósicas. Estudo comparativo entre Eucalyptus globulus e outras folhosas*.
-

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Tese de Doutoramento em Química. Universidade de Aveiro.

Portucel Soporcel. grupo Portucel Soporcel. Acedido em 8-06-2015. Disponível em <http://www.portucelsoporcel.com/Sustentabilidade/Floresta-Sustentavel/Eucalipto>.

Roncero, M. B.; Torres, A. L.; Colom, J. F.; Vidal, T. (1999) *Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of Eucalyptus pul.* Process Biochemistry 36 (2000) 45–50.

Sêco, I. M. C. L. (2006) *Reversão da brancura em pastas kraft de Eucalyptus globulus.* Tese de Mestrado em Engenharia dos Processos de Produção de Pasta e Papel. Universidade de Aveiro.

Sêco, I. M. C. L.; Neto, C. P.; Silvestre, A. J. D. (2008) *Strategies to reduce the brightness reversion of industrial ECF bleached Eucalyptus globulus kraft pulp.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology 83:218–226.

Shatalov, A. A.; Pereira, H. (2006) *Xylanase pre-treatment of giant reed organosolv pulps: Direct bleaching effect and bleach boosting.* Industrial Crops and Products. 25 (2007) 248-256.

Shatalov, A. A.; Pereira, H. (2007) *Effect of xylanases on peroxide bleachability of eucalypt (E. globulus) kraft pulp.* Biochemical Engineering Journal 40 (2008) 19–26.

Silva, M. E. C. M. (2010) *Composição química da madeira.* Apontamentos de tecnologia dos produtos florestais. UTAD.

Sixta, H.; Potthast, A.; Krostscheck, A. W. (2006) “Chemical Pulping Processes” in Sixta, H. (ed). *Handbook of pulp.* Austria : Wiley-VCH, Vol. 1. Cap. 4, 109-511.

Sixta, H.; Suss, H.-U.; Potthast, A.; Schwanninger, M.; Krostscheck, A. W. (2006) “Pulp Bleaching” in Sixta, H. (ed). *Handbook of pulp.* Austria : Wiley-VCH, Vol. 2. Cap. 7, 609-932.

Sjöström, E. (1981) *Wood Chemistry - Fundamentals and Applications.* London: Academic Press.

Skals, P. B.; Krabek, A.; Nielsen, P.H.; Wenzel, H. (2008) *Environmental Assessment of Enzyme Assisted Processing in Pulp and Paper Industry.* Int. J. LCA, 13(2), 124-132.

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

Sun, R. C.; Tomkinson, J.; Wang, Y. X.; Xiao, B. (1999) *Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction.* Polymer 41 (2000) 2647–2656.

- Tolan, J. S. e Guenette, M., 1997. "Using Enzymes in Pulp Bleaching: Mill Applications" in: K. L. Eriksson, (ed). *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. New York: Springer. Vol 57, 291-310.
- Torres, A.L.; Roncero, M. B.; Colom, J. F.; Pastor, F. I. J.; Blanco, A.; Vidal, T. (1999) *Effect of a novel enzyme on fibre morphology during ECF bleaching of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulps*. *Bioresource Technology* 74 (2000) 135-140.
- Valenzuela, S. V.; Valls, C.; Roncero, M. B.; Vidal, T.; Diaz, P.; Pastor, F. I. J. (2013) *Effectiveness of novel xylanases belonging to different GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 89, 401-406.
- Viikari, Liisa e Lantto, Raija. (2002). *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: 8TH ICBPPI MEETING*. Pogress in Biotechnology. Volume 21. Finland.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

ANEXOS

ANEXO I. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

I.1. Preparação dos Ensaios

Num saco de plástico são introduzidos os reagentes correspondentes ao estágio de branqueamento que se pretende realizar: a pasta juntamente com a solução enzimática, ou com o Dióxido de Cloro (ClO₂), ou com o Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂) e o Hidróxido de Sódio (NaOH). É necessário ter em conta o conceito de consistência e de carga para conhecer as quantidades de reagentes necessárias a adicionar:

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

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

I.1.1. Determinação do Teor de Secura e Massa de Pasta Húmida

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

$$\text{Teor de Secura} = \frac{\text{massa de pasta seca (g)}}{\text{massa de pasta húmida (g)}} \quad \text{Eq. III}$$

Consequentemente é possível determinar, através da Eq. III a massa de pasta húmida a utilizar em cada ensaio. Todos os ensaios foram efetuados com 20 g de pasta em base seca.

Sabe-se que a pasta armazenada contém alguma água, sendo necessário determinar a massa de pasta húmida a pesar, tendo em conta a definição de teor de secura apresentada. Em geral, a pasta lavada e espremida, armazenada no frigorífico, tem um teor de secura de 0,3.

I.1.2. Cálculo da quantidade de Reagentes

- **Solução enzimática**

A solução enzimática fornecida era extremamente concentrada, pelo que, a dose de enzima a utilizar nos ensaios, em mL de solução enzimática (tal qual como é fornecida), por tonelada de pasta “*air dry*” (10% de humidade), deve ser transposta para as condições laboratoriais, onde se utilizam 20 g de pasta seca por ensaio. Assim, para determinar o volume de solução enzimática a usar, tal qual como é fornecida, aplica-se a Equação IV:

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

Uma vez que à escala laboratorial este volume era muito pequeno, foi necessário fazer diluições da solução de enzima original para diminuir os erros associados às medições. Procedeu-se, dependendo do ensaio a realizar, a duas diluições diferentes da enzima, sendo uma de 1:1000 e a outra de 1:500. O volume de solução enzimática a medir deve ter em conta esta diluição:

$$V_{solução} = V_{enzima} \times 1000 \quad \text{ou} \quad V_{solução} = V_{enzima} \times 500 \quad \text{Eq. V}$$

- **Solução de ClO₂, H₂O₂ e NaOH**

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

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

Onde m_{ps} é a massa de pasta em base seca. Uma vez que os reagentes são usados em pequenas quantidades é necessário preparar uma solução com uma concentração perfeitamente conhecida (g/L). Assim tem-se,

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

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

A massa volúmica da solução de reagente determina-se medindo a massa correspondente a 10 mL de solução.

- **Água ou Tampão a adicionar**

Os ensaios foram realizados a 10% de consistência, usando 20 g de pasta em base seca por ensaio são suficientes para efetuar análises posteriormente. Sendo:

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

Pelo que a massa de suspensão será de 200 g.

Para garantir pH estável, no estágio enzimático foi utilizada solução tampão, em vez de água.

Nos restantes estágios de branqueamento foi utilizada água destilada.

A massa de água destilada ou tampão a adicionar é dada pelo balanço:

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

I.1.3. Preparação da Solução Tampão

O estágio de branqueamento com enzimas exige um controlo apertado do pH da suspensão. Desta forma, para se assegurar um determinado valor de pH da suspensão ao longo do estágio enzimático foi preparado um tampão Britton-Robinson (Tampão B-R) o qual pode ser usado para uma gama de pH de 4 a 11,6;

- Misturar a Parte A e a Parte B apresentadas na Tabela 0.1, segundo as indicações da Tabela 0.2;
- Pesar as quantidades apresentadas na Tabela 0.1 e perfazer o volume de 1 L para cada uma das partes com água destilada.
- Para ajustar o pH final adicionar algumas gotas de hidróxido de sódio 1M, no caso de se pretender aumentar o pH, ou algum dos ácidos da parte A para diminuir o pH.

Tabela 0-1. Massa necessária de cada composto para preparar 1 L de tampão B-R.

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

Tabela 0-2. Quantidade necessária de parte A e B necessária para preparar o tampão B-R com 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

I.1.4. Determinação da Concentração de Dióxido de Cloro Concentrado

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



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

Reagentes

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

- Cloreto de titânio a 1,5% (diluir 10x a solução comercial de 15%, da Merck B406407946, 500 mL)

Material

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

Procedimento Experimental:

- Medir 25 mL de iodeto de potássio a 10% e cerca de 50 mL de água destilada e introduzir os dois volumes num copo de 250 mL. Juntar à solução anterior uma quantidade de tampão de borato (pH 8,3) que se verifique apropriada para a reação ocorrer em meio neutro ou ligeiramente alcalino (~3x pipetas Pasteur). Adicionar 5,0 ml (no caso do residual, adicionar 25 ml) de solução de dióxido de cloro a titular (esta operação deve ser efetuada no interior de uma hotte; alternativa: pesar 5,830 g de solução de 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:
- O iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio adicionando-se 1 ml de cozimento de amido como indicador após a solução ficar amarelo claro. O volume de tiosulfato gasto quando a solução muda de violeta para incolor é designado por V_1 . (levar a contagem de volume de titulante a zero.)
- Adiciona-se em seguida ácido clorídrico para o pH da solução ficar abaixo de 2, ocorrendo a seguinte reação:
- A solução fica novamente violeta, e o iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio. O volume gasto nesta segunda titulação é designado por V_2 . (levar a contagem de volume de titulante a zero.)
- Adiciona-se novamente ácido clorídrico para descer o pH da solução até à gama de 0,7-1,0. De seguida adiciona-se excesso de solução de cloreto de titânio a 1,5% (~3 mL). A solução fica novamente violeta porque ocorrem as seguintes reações:

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

Cálculos:

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

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

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

$$C_{\text{ClO}_2} = 67,5 \times M \times \frac{V_1}{V_a} \quad (\text{g/L}) \qquad \text{Eq. XII}$$

$$C_{\text{ClO}_2} = 67,5 \times M \times \frac{(V_2 - 4 \times V_1)}{4 \times V_a} \quad (\text{g/L}) \qquad \text{Eq. XIII}$$

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

$$C_{\text{ClO}_2} = 67,5 \times M \times \frac{V_2}{4 \times V_a} \quad (\text{g/L}) \qquad \text{Eq. XIV}$$

$$C_{\text{Cl}_2} = 71 \times M \times \frac{(V_1 - \frac{V_2}{4})}{2 \times V_a} \quad (\text{g/L}) \qquad \text{Eq. XV}$$

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

$$C_{ClO_2^-} = 1000 \times M \times \frac{V_3}{4 \times V_a} - 83,5 \quad (mg/L) \quad \text{Eq. XVI}$$

Para as expressões acima descritas foram utilizadas as seguintes notações:

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

V_a= Volume de amostra (titulado), mL;

V₁, V₂, V₃= Consumo de tiosulfato de sódio em cada titulação, mL.

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

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

Para converter gClO₂/L em gCl₂ activo/L multiplica-se o primeiro por 2,63.

I.1.5. Preparação e aferição da solução de NaOH

Reagentes

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

Material

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

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

Numa balança, colocar um copo de 2 litros e pesar 244,27 g de BaCl₂ • 2H₂O e adicionar água destilada até obter 1000g de solução.

Preparação do ácido clorídrico 0,01M padrão

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

Procedimento Experimental:

- Pesar aproximadamente 15 g de NaOH;
- Colocar num balão de diluição (1 L), adicionar água destilada e homogeneizar a solução; deixar arrefecer; perfazer o volume do balão com água destilada. Esta será a solução de NaOH a utilizar nos ensaios e da qual se pretende agora saber a verdadeira concentração.
- Diluir a solução anterior, retirando 20 mL da solução de NaOH para um balão de diluição (500 mL) e adicionar água destilada até perfazer o volume do balão;
- Colocar no TITRINO a solução de HCl (0,01 M);
- Introduzir o eletrodo de pH no suporte do TITRINO, ligá-lo ao aparelho de análise e colocá-los em água destilada;
- No TITRINO, usando o teclado, premir User method (3) Recall method Enter;
- Escolher o método pretendido, premindo repetidamente Select até se visualizar no ecrã “NaOH PGL” Enter;
- Colocar num copo 25 mL da solução de NaOH diluído e adicionar 10 mL de cloreto de bário, para precipitar os carbonatos existentes na solução;
- Colocar o copo no TRITINO, introduzindo o eletrodo com o cuidado de submergir a cabeça do eletrodo sem tocar no magnete;
- Ligar a agitação e premir START para dar início à titulação;
- Quando a curva de titulação estabilizar (aparece EP1) e o TITRINO automaticamente terminará a titulação;
- Registar o valor do ponto de equivalência obtido (volume de titulante gasto em mL e o pH), presente no visor do TRITINO;
- Lavar os eletrodos com água destilada e limpá-los;
- Efetuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0.5ml de volume de titulante).

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Cálculos:

Cálculo da concentração de NaOH na solução original:

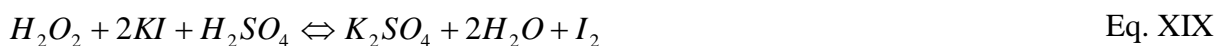
$$[\text{NaOH}] = \frac{V_{\text{HCl}} \times [\text{HCl}]}{V_{\text{toma}}} \times \text{fator de diluição} \times 40 \quad (\text{g/L}) \quad \text{Eq. XVII}$$

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

$$[\text{NaOH}] = V_{\text{HCl}} \times 0,4 \quad (\text{g/L}) \quad \text{Eq. XVIII}$$

I.1.6. Determinação da Concentração de Peroxido de Hidrogénio Concentrado

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



Reagentes

- H_2SO_4 , 2 M (4 N)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.1 M (0,1 N)
- KI, 1 M
- H_2O_2 (~20 g/L)
- Solução de Molibdato de Amónio (5%)

Material

- Titrino
- Frascos com Kipp de 15 e 20 mL
- Eléctrodo de Platina
- Pipeta de Pasteur
- Balão Volumétrico de 25, 1000 e 2000 mL
- Magnetes

- Copo de 150 mL
- Pêra
- Pipetas volumétricas de 10mL

Procedimento experimental:**Preparação da solução de H₂SO₄ 2M (4 N):**

- Diluir 408,64 g de ácido concentrado (pureza: 96%, densidade: 1,84 kg/L, massa molecular: 98,08 g/mol) num balão volumétrico de 2000 mL em água destilada. **ATENÇÃO:** MISTURA ALTAMENTE EXOTÉRMICA! Colocar primeiro aproximadamente 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.
- Transferir a solução para um frasco com Kipp de 20 mL.

Preparação da solução de KI 1N:

- Pesar 166,33 g para um copo;
- Dissolver com um pouco de água destilada, introduzir num balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada;
- Transferir a solução para um frasco com Kipp de 15 mL.

Preparação de Molibdato de Amónio a 5%:

- Pesar 1,525 g para um copo;
- Dissolver com um pouco de água destilada, introduzir num balão volumétrico de 25 mL e perfazer com água destilada.

ATENÇÃO: a solução tem apenas validade de uma semana!

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

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

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

Preparação da solução de Peróxido de Hidrogénio:

- Introduzir cerca de 1500 ml de água destilada num balão volumétrico de 2000 ml;
- Pesar 119.07 g de Peróxido de Hidrogénio (a 49.5% W/W), transferir de imediato para o balão e perfazer o volume com água destilada;
- Transferir a solução para um frasco de armazenamento (castanho) e inertizar com azoto.

Determinação da Concentração inicial:

1. Colocar no TITRINO a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 M);
2. Introduzir o eléctrodo no suporte do TITRINO, ligá-lo ao aparelho de análise e colocá-los em água destilada;
3. No TITRINO, usando o teclado, premir User method (3) → Recall method → Enter;
4. Escolher o método pretendido, premindo repetidamente Select até se visualizar no ecrã “H2O2” → Enter;
5. Pipetar 25 mL da solução concentrada de Peróxido de Hidrogénio (~35 g/L) para um balão volumétrico de 500 mL e perfazer o volume com água destilada (solução diluída de H2O2);
6. Introduzir num copo de 100 mL, 40 mL de ácido sulfúrico, 3 gotas de molibdato de amónio e um magnete;
7. Adicionar 10 mL da solução diluída de peróxido de hidrogénio preparada no ponto 5 e 15 mL de iodeto de potássio;
8. Colocar o copo no TRITINO, introduzindo o eléctrodo;
9. Premir START para dar início à titulação;

10. Quando a curva de titulação estabilizar (aparece EP1) e o TITRINO automaticamente terminará a titulação;
11. Registrar o valor do ponto de equivalência obtido (volume de titulante gasto em mL), presente no visor do TRITINO;
12. Lavar os eléctrodos com água destilada e limpá-los;
13. Fazer um duplicado e obter o valor médio.

Cálculos:

A concentração inicial de peróxido de hidrogénio é dada por:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{1}{2} \times \frac{[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] \times V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}{V_{\text{toma}}} \times \text{fator de diluição} \times 34 \quad (\text{g/L}) \quad \text{Eq. XXI}$$

em que $[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] = 0,1 \text{ mol/L}$ e $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ é o volume gasto de titulante, em mL; o factor de diluição é $(500/25=20)$; $V_{\text{toma}}=10 \text{ mL}$; a massa molar $M(\text{H}_2\text{O}_2)=34 \text{ g/mol}$ permite expressar a concentração em g/L; o factor $\frac{1}{2}$ respeita a estequiometria da reacção de titulação: $n(\text{H}_2\text{O}_2):n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 1:2$. Numa forma condensada tem-se:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 3,4 \quad (\text{g/L}) \quad \text{Eq. XXII}$$

I.2. Metodologia Experimental de Branqueamento

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

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 (Equação IX) 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 10 minutos. Após os dez minutos colocar a pasta no banho a aquecer durante 5 minutos.

- Estágio D e EP: Pesar os reagentes necessários ao branqueamento num gobelé, deixando o H_2O_2 (caso seja utilizado) para último. Registar os valores exatos. (As massas dos reagentes são determinadas como explicado em cima) Misturar os reagentes e adiciona-los à pasta, tendo o cuidado de lavar os gobelés com uma parte da água necessária.
- Fechar o saco, retirando o máximo de ar possível, 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 auxílio de uma rede metálica. Guardar o filtrado num frasco tapado em gelo para medição do pH. O filtrado proveniente do estágio X deverá ser guardado em dois frascos com tampa devidamente identificados e armazenar um no congelador e outro no frigorífico, para posteriores análises.
 - Lavar a pasta com 3 litros de água destilada, a uma temperatura de 35°C, repartidos em 3 partes iguais de forma a realizar 3 lavagens.
 - Guardar a pasta num saco de plástico, após ter sido espremida à mão e esfarelada, e colocá-la no frigorífico devidamente identificada ou iniciar o procedimento de branqueamento novamente caso se pretenda prosseguir na sequência de branqueamento.

I.3. Filtrados residuais

I.2.1. Determinação da Concentração de Dióxido de Cloro Residual

O procedimento de determinação da concentração de Dióxido de Cloro Residual é idêntico ao descrito no Anexo I.1.4.

I.2.2. Determinação da Concentração de NaOH residual

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

Materiais

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

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 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e adicionar água destilada até obter 1000 g de solução.

Preparação do ácido clorídrico 0,01M padrão

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

Procedimento Experimental:

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

NOTA: Caso não haja residual suficiente proceder de acordo com a Tabela 0.3:

Tabela 0-3. Volume de cloreto de bário a utilizar em função do volume de filtrado disponível.

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

- Filtrar para um frasco com a ajuda de um funil e papel de filtro e tapar o frasco;
- Medir 25 mL de amostra para um copo+magnete;
- Colocar no TITRINO a solução de HCl (0,01 M);
- Introduzir o eléctrodo de pH no suporte do TITRINO, ligá-lo ao aparelho de análise e colocá-los em água destilada;

- No TITRINO, usando o teclado, premir User method (3) → Recall method → Enter;
- Escolher o método pretendido, premindo repetidamente Select até se visualizar no ecrã “NaOH PGL” → Enter;
- Medir 25 mL da amostra filtrada para um copo de 50 mL com magnete;
- Colocar o copo no TRITINO, introduzindo o eléctrodo com o cuidado de submergir a cabeça do eléctrodo sem tocar no magnete;
- Ligar a agitação e premir START para dar início à titulação;
- Quando a curva de titulação estabilizar (aparece EP1) e o TITRINO automaticamente terminará a titulação;
- Premir Select até aparecer Fix EP's → premir Enter; registar o valor do volume gasto de titulante até um pH=8,6 (o método seleccionado faz automaticamente esta avaliação);
- Efectuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0.5 mL de volume de titulante).

Cálculos:

Cálculo da concentração de OH⁻ no licor residual.

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

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

I.2.3. Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogénio Residual

Esta é feita por iodometria, em que se utiliza molibdato de amónio que atua como catalisador, acelerando a reacção de formação de iodo livre.

Reagentes:

- H₂SO₄, 2 M (4 N)
- Na₂S₂O₃, 0.1 M (0,1 N)
- KI, 1 M
- Cozimento de amido

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

- Solução de Molibdato de Amónio (5%)

Material:

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

Procedimento experimental:

Preparação da solução de H₂SO₄ 2M (4 N)

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

Preparação da solução de KI 1N:

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

Preparação de Molibdato de Amónio a 5%:

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

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

- Introduzir o conteúdo de uma ampola de Tiosulfato de Sódio 0,1 N num balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada;

- Transferir a solução para um frasco compatível com a unidade intermutável do TITRINO.

Preparação do Cozimento de Amido (indicador):

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

Determinação da Concentração residual:

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

Cálculos:

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

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

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

$$[H_2O_2] = 0,17 \times V_{Na_2SO_3} \left(\frac{g}{L} \right) \quad \text{Eq. XXV}$$

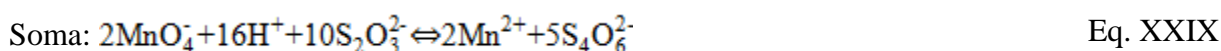
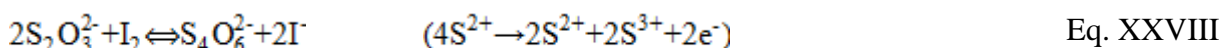
I.4. Caraterização das Pastas

I.4.1. Determinação do Índice Kappa (IK)

A lenhina é suscetível de sofrer oxidação (em particular nos seus anéis aromáticos) por vários oxidantes, como por exemplo o permanganato de potássio em condições ácidas. 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 é descrito na norma NP 3186 e o índice kappa da pasta é determinado a partir do número de mililitros de uma solução de permanganato de potássio 0,1 N consumidos por grama de pasta absolutamente seca, sob condições normalizadas, sendo o resultado corrigido para um consumo de 50% (isto porque se deve utilizar uma quantidade de permanganato tal que leve a um consumo próximo de 50% do adicionado). O permanganato não consumido ao fim de exatamente 10 minutos de reação com a suspensão de pasta, é determinado por iodometria: à suspensão é adicionada iodeto de potássio, em excesso, que vai reagir com o permanganato não consumido segundo a reação equação XXVII.



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



(por cada mol de MnO_4^- consome-se 5 moles de $S_2O_3^{2-}$ i.e. $5e^-/\text{mol}$).

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

$$IK = C \times d / W \quad \text{Eq. XXX}$$

No procedimento seguido no DEQ, denominado “Micro-kappa”, são usados menos quantidade de reagentes e de menor concentração em relação ao referido na norma NP3186, onde **d** é o fator de correção para um consumo de 50% de permanganato (ver Tabela 0.4), o qual depende do valor de $C = 0,5 \cdot (VB - Vt) \cdot [Na_2SO_3] / (5 \cdot [KMnO_4])$;

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

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

$$LT(\text{em } \%) = 0,15 \times IK \quad \text{Eq. XXXI}$$

embora esta proporcionalidade seja influenciada pela espécie de madeira e tipo de cozimento.

Para *E. globulus* nacional obteve-se a seguinte relação:

$$LT(\%) = 0,187 \times IK - 0,75 \quad (R^2 = 0.9900) \quad \text{Eq. XXXII}$$

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

Reagentes:

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

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

Material:

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

Procedimento Experimental:

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

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

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

Preparação da solução do KI 1M:

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

Preparação da solução de Na₂S₂O₃ 0,05N:

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

Metodologia:

- Pesa-se com a precisão de 0,1 mg, uma quantidade da pasta que consuma cerca de 50% (ponderal) da solução de permanganato de potássio do ensaio em branco (sem pasta). (pesar 2 0,7 g do pasta seca para IK~7,5 ou ~0,35 g do pasta seca para IK~15; como, normalmente, as amostras de pasta húmida têm um teor de secura ~0,3 g fibra/g pasta, dever-se-á pesar ~2,3 g de pasta húmida ou ~1,1 g, respetivamente).
- Introduzir a pasta previamente pesada num copo de 400 mL e adicionar 150 mL de água destilada;
- Colocar o copo com o seu conteúdo num banho termostático regulado para a temperatura de 25°C, segurando-o lateralmente com uma pinça; desintegrar com o agitador (10 a 15 min) regulando a velocidade de rotação (posição 1 do agitador Heidolph);
- Pipetar para um copo de 100 mL, 20 mL de permanganato de potássio (0,01 mol/L) e 20 mL de ácido sulfúrico (2 mol/L);
- Aquecer a mistura anterior até à temperatura do 25°C e adicionar à suspensão de pasta desintegrada, ligando simultaneamente o cronómetro. Lavar o copo com 10 mL de água e adicionar esta água a suspensão. O volume final da suspensão no copo que contém a pasta deve ser de 200 mL;
- Interromper a reação ao fim de 10 minutos, contados a partir da adição do permanganato de potássio, juntando 10 mL de iodeto do potássio (1 mol/L);
- Titular o iodo libertado com tiosulfato de sódio utilizando o cozimento de amido, como indicador, o qual é adicionado perto do fim da titulação, quando esta apresentar uma cor amarela clarinha; o amido vira do azul-escuro para branco/ incolor (Nota: se a massa do pasta for a adequada deve-se gastar ~10 mL, que é cerca de metade do volume gasto no ensaio Branco; caso contrário, corrigir a massa de pasta para que isso aconteça; A repetibilidade é inferior a 0,5 unidades de IK.
Nota: Dada a volatilidade do iodo o tempo decorrido entre a adição da solução de iodeto de potássio e o ponto final da titulação deve ser o mais curto possível.
- Realizar o ensaio “Branco” procedendo de modo idêntico ao descrito, mas sem pasta. A solução de iodeto de potássio pode-se juntar imediatamente após a adição da solução de permanganato de potássio e do ácido sulfúrico. Gasta-se ~20 mL.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Tabela 0-4. 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									

I.4.2. Determinação da Viscosidade Intrínseca

Devido à elevada massa molecular e grau de cristalinidade da celulose, esta não é solúvel na maioria dos solventes. Idealmente, o processo de dissolução da celulose deveria resultar de uma completa desintegração em moléculas individuais sem alteração do comprimento da cadeia. De todos os solventes usados para esse efeito, a cupri-etilenodiamina (CED), complexo de cobre e amina, é o mais vulgar, sendo extensamente utilizado na determinação de viscosidades de pastas a nível industrial. A viscosidade traduz o grau de degradação (ou despolimerização) da celulose, sendo portanto uma característica da pasta que é imprescindível determinar. Um dos métodos mais simples de a determinar consiste em comparar o tempo de escoamento de um determinado volume de solução de pasta celulósica através de um capilar de um viscosímetro e o tempo de escoamento do solvente puro (normas SCAN-CM 15 e ISO 5351). Em geral, a viscosidade (aparente) de soluções de polímeros de elevado peso molecular varia com o gradiente de velocidade, apresentando no caso da celulose um comportamento pseudoplástico. Além disso, a viscosidade de soluções de celulose depende ainda da concentração da solução (C, em kg/dm^3), aumentando com ela. Por isso, a viscosidade deve ser determinada em condições tais que a interação entre as suas moléculas seja desprezável (quando a concentração da celulose no solvente tende para zero), atingindo-se o que se designa por número limite de viscosidade ou, mais correntemente, viscosidade intrínseca $[\eta]$, definida por:

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

onde $\eta_{\text{rel}} = \eta/\eta_0$, sendo η e η_0 a viscosidade da solução e do solvente, respetivamente. Esta definição ilustra a razão pela qual normalmente se exprime a viscosidade em unidades de (concentração)⁻¹. O resultado é convertido em viscosidade intrínseca pela fórmula de Martin a qual traduz a dependência da viscosidade de uma solução de celulose em CED (0,5 M) relativamente à concentração:

$$\eta_{\text{rel}} - 1 = [\eta]C e^{k'[\eta]C} \quad \text{Eq. XXXIV}$$

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

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

das pastas celulósicas a serem testadas, sendo, nestas condições, as viscosidades aparentes das soluções próximas de 15 mPa.s.

Antes de proceder às medições no viscosímetro é necessário desintegrar a amostra de pasta, em água, e, em seguida, solubilizá-la em CED, sendo 30 minutos o tempo máximo indicado na norma SCAN-CM 15 para cada uma destas operações. A pasta não deve ter um índice kappa superior a 18-20 (lenhina Klason maior que cerca de 2%) pois pode não ocorrer a completa solubilização da amostra. A repetibilidade do ensaio (isto é, a diferença entre 2 determinações efectuadas na mesma amostra) é inferior a 25 dm³/kg.

Reagentes e Material:

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

Procedimento Experimental

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

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

Preparação da solução de ensaio

Se o valor da viscosidade da amostra for previamente conhecido, escolhe-se a massa de pasta (em base seca) como indicado na Tabela 0.5.

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

- Aspirar 1 ou 2 vezes a solução para o viscosímetro para lavar o capilar, aspirar de novo e medir o tempo de escoamento entre as duas marcas, com uma precisão de $\pm 0,2$ s. Efetuar pelo menos duas medições que sejam concordantes, $\pm 0,5$ s.
- Despejar a solução anterior para um coador, para que as bolas e o cobre não sigam para o esgoto! Guardar o resíduo da solução de CED num frasco de “resíduos de CED” para enviar posteriormente para uma empresa de tratamento de resíduos.
- Calcular o tempo de escoamento médio e a viscosidade relativa. Usar a Tabela 0.6 para obter o valor do produto $c[\eta]$ e calcular a viscosidade da solução da amostra de pasta ensaiada.
- Efetuar novo ensaio e determinar a média, arredondando o resultado às dezenas. Corrigir a massa de pasta a pesar se o produto $c[\eta]$ estiver fora do intervalo $3 \pm 0,1$.

Tabela 0-6. Produto $c[\eta]$ correspondente a diferentes rácios de viscosidade (η rácio)

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

I.4.3. Preparação de Folhas para Medição da Brancura ISO

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

Procedimento:

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

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

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

- Após a secagem prensar novamente as folhas durante 30 segundos, usando desta vez só 1 mata-borrão.

I.4.4. Determinação de Ácidos Hexenurónicos

Reagentes:

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

Material

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

Preparação da solução de cloreto de mercúrio/acetato de sódio:

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

Metodologia:

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

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

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

$$C_{\text{HexA}} (\text{mmol/kg}) = \frac{0,278 \times (A_{260} - 1,2 \times A_{290}) \times V_{\text{hidrolisado}}}{m_{\text{pasta seca}}} \quad \text{Eq. XXXV}$$

onde, m: massa da amostra de pasta absolutamente seca, g; A260: absorvância da amostra a 260 nm; A290: absorvância da amostra a 290 nm; V: volume de hidrolisado, mL (40 mL neste caso).

I.4.5. Determinação da Lenhina

A. Procedimento Lenhina Klason (para detalhes ver TAPPI T222):

Preparação de H2SO4 a 72%:

- Colocar um balão volumétrico num recipiente com gelo;
- Adicionar 300 mL de água destilada ao balão;

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

- Adicionar, cuidadosamente, 665 mL de ácido sulfúrico concentrado (95,5-96,5%);
- Após arrefecer, acertar com água destilada até à marca.

Metodologia:

1. Pesar 2 g (base seca) de pasta moída para um copo de 100 mL.
2. Adicionar 40 mL de H₂SO₄ 72% e homogeneizar bem a mistura com uma vareta de vidro. Deixar hidrolisar durante duas horas a 20°C, mexendo de 15 em 15 minutos.
3. Aquecer ~1600 mL água destilada (por excesso), num balão Erlenmeyer (com uma marca nos 1540 mL), até cerca de 90°C durante a última hora da hidrólise primária – HP (passo 2). No final retirar uma parte da água quente do Erlenmeyer para um copo para ser usada como água de lavagem.
4. No fim das duas horas, transferir a mistura DEVAGAR para o Erlenmeyer contendo água quente. Uma vez que a água está perto do ponto de ebulição, a diluição do ácido de 72% para 3% pode provocar uma ebulição descontrolada e perda de material. Utilizar a água retirada do Erlenmeyer para lavagem do copo de modo a garantir que todo o material foi transferido e perfazer o volume de 1540 mL
5. Deixar em ebulição durante 4h, adicionando água quente (95-100°C) de modo a manter o volume constante. Caso a ebulição esteja muito forte, pode ser adicionado um pouco de água mais fria.
6. Após as 4h de ebulição, retirar o Erlenmeyer da placa, aferir o volume até à marca de 1540 mL e deixar em repouso durante a noite (de preferência inclinado entre 20 e 40° (Figura 0.1)) para sedimentação da Lenhina.
7. No dia seguinte, filtrar a vácuo, o sedimento (lenhina insolúvel) num cadinho de placa porosa com papel de filtro (Macherey-Nagel, 25 Rundfilter MN GF-1 (é necessário cortar à medida do cadinho)) previamente seco e tarado.
8. Antes de lavar o Erlenmeyer com água destilada, medir o volume do filtrado e recolher uma amostra para um frasco (com o filtrado recolhido é possível determinar a lenhina solúvel, por espectrofotometria UV a 205 nm).
9. Lavar o Erlenmeyer, bem lavado, com água destilada, recolhendo todo o material insolúvel para o cadinho.
10. O cadinho com a lenhina é seco a 105°C até peso constante (>4h, máximo durante a noite).

11. Determinar Lenhina Klason do seguinte modo:

$$LK(\%) = \frac{m_{\text{lenhina}}}{m_{\text{pasta}}} \times 100$$

Eq. XXXVI

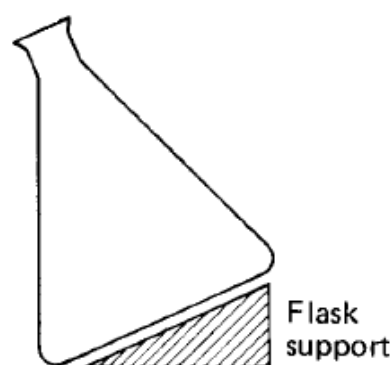


Figura 0.1. Inclinação do Erlenmeyer para sedimentação da lenhina insolúvel (adaptado de Tappi T 222).

B. Procedimento de Lenhina Solúvel (TAPPI UM 250)

1. Diluir o hidrolisado obtido anteriormente de modo a que a sua absorvância (Abs) a 205 nm se encontre entre 0.2 e 0.8. Proceder ao seguinte cálculo tendo em conta o volume total (V_{Total}) de hidrolisado obtido (ponto A.8), do factor de diluição (FD) utilizado, da massa de pasta inicial (M_{inicial}) e do coeficiente específico de extinção da lenhina (110):

$$ASL(\%) = \frac{Abs}{110} \times FD \times \frac{V_{\text{Total}}}{M_{\text{inicial}}}$$

Eq. XXXVII

I.4.6. Caracterização de Hidratos de Carbono – Método LAP – 006 adaptado (ponto 8.5 - método para a determinação da atividade das celulases)

Preparação do DNS – Ácido dinitrossalicílico:

Reagentes:

- Água destilada-1416 mL;
- Ácido 3,5 dinitrossalicílico-10,6 g;
- Hidróxido de Sódio-19,8 g;

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

- Tartarato de sódio e potássio-306 g;
- Fenol (previamente fundido a 50°C)-7,6 mL;
- Metalissulfito de sódio - 8,3 g

Preparação:

Dissolver o NaOH em cerca de metade da quantidade de água, e de seguida juntar o ácido 3,5 dinitrossalicílico.

À parte, dissolver cada um dos restantes reagentes e adicionar à mistura inicial.

Preparação do tampão Citrato 0,05 M, pH 4,8:

Reagentes:

- Ácido cítrico monohidratado – 210 g
- Água destilada – 750 mL
- NaOH a adicionar até pH 4,3 – 50 a 60 g

Preparação:

Diluir todos os reagentes de modo a perfazer 1 L de solução e verificar o pH. Se necessário adicionar NaOH até pH 4,5.

Após efetuar a diluição completa até 0,05 M, o pH deve ser 4,8. Caso não se verifique é necessário ajustar o pH.

Análise das amostras de filtrado:

Colocar em tubos de ensaio com tampa:

- Branco: 1 mL tampão + 0,5 mL água destilada + 3 mL DNS
 - Amostra: 1 mL tampão + 0,5 mL amostra + 3 mL DNS
- (no caso das amostras, fazer em duplicado)

Colocar os tubos de ensaio num banho de água a ferver, durante 5 min.

De seguida, colocar os tubos de ensaio num banho de água + gelo.

Medir a absorvância a 540 nm, para isso é necessário juntar 200 µL da amostra + 2,5 mL de água destilada.

Construção das curvas de calibração:**Reagentes necessários:**

- Xilose padrão
- Reagente DNS
- Tampão Citrato
- Água destilada

Preparação:

Colocar em todos os tubos de ensaio com tampa (3 tubos, o branco e dois ensaios para cada solução de xilose) a respetiva quantidade de xilose e volume de tampão que são apresentados na Tabela 0.7, 0.8 e 0.9 (consoante se trate da curva de calibração 1, 2 ou 3, respetivamente) e 3 mL de DNS.

Colocar num banho de água a ferver durante 5 min. Colocar os tubos num banho de água e gelo (para fazer parar a reação).

Ler a absorvância para 540 nm (colocar na célula 2,5 mL de água destilada e 200 μ L de cada amostra).

O branco é constituído por 1 mL de tampão, 0,5 mL de água destilada e 3 mL de DNS.

Nota: Deve ser construída uma nova curva de calibração de cada vez que se utiliza novo reagente de DNS.

- **Curva de calibração 1:**

A Tabela 0.7 apresenta os dados necessários à obtenção da curva de calibração representada na Figura 0.2.

Tabela 0-7. Quantidade necessária de xilose e de volume de tampão, e respetivas absorvâncias para a curva de calibração 1.

[Xilose] sol stock (mg/mL)	V stock (mL)	V tampão (mL)	[Xilose] (mg/mL)	Abs a 540 nm		
				A	B	Média
5	0,1	0,4	1,0	0,20	0,22	0,209

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

	0,15	0,35	1,5	0,32	0,33	0,329
	0,2	0,3	2,0	0,39	0,40	0,397
	0,3	0,2	3,0	0,58	0,57	0,577
	0,4	0,1	4,0	0,77	0,77	0,768
	0,45	0,05	4,5	0,82	0,86	0,833
	0,5	0	5,0	0,92	0,90	0,913
0,5	0,1	0,4	0,1	0,01	0,03	0,019
	0,1	0,4	0,2	0,05	0,04	0,046
1	0,2	0,3	0,4	0,07	0,08	0,072
	0,3	0,2	0,6	0,12	0,11	0,117

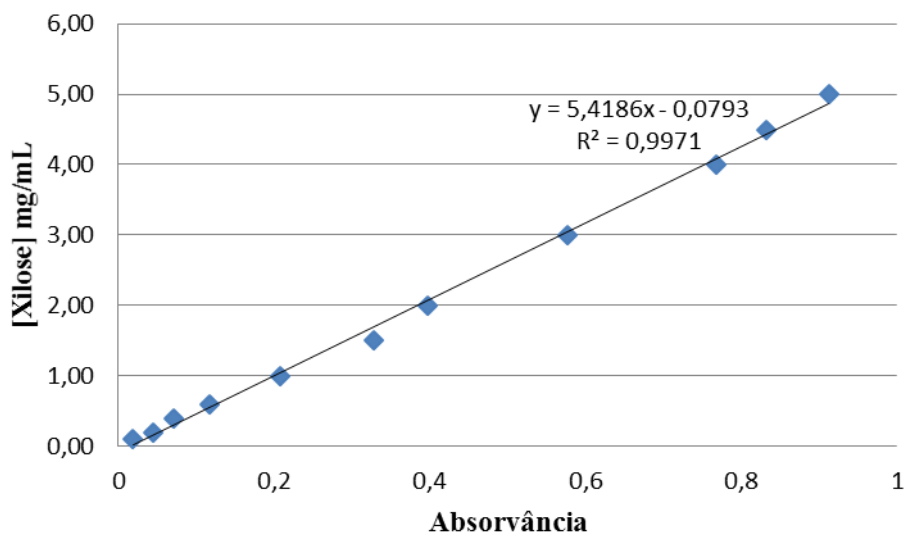


Figura 0.2. Curva de calibração 1.

• **Curava de calibração 2:**

A Tabela 0.8 apresenta os dados necessários à obtenção da curva de calibração representada na Figura 0.3.

Tabela 0-8. Quantidade necessária de xilose e de volume de tampão, e respectivas absorvâncias para a curva de calibração 2.

[Xilose] sol stock (mg/mL)	V stock (mL)	V tampão (mL)	[Xilose] (mg/mL)	Abs 540 nm		
				A	B	Média
5,0	0,1	0,4	1,0	0,21	0,19	0,201

	0,2	0,3	2,0	0,39	0,37	0,381
	0,3	0,2	3,0	0,57	0,58	0,573
	0,4	0,1	4,0	0,76	0,77	0,764
	0,5	0	5,0	0,90	0,93	0,914
0,5	0,1	0,4	0,1	0,02	0,01	0,013
1,0	0,1	0,4	0,2	0,02	0,03	0,022
	0,3	0,2	0,6	0,10	0,10	0,101

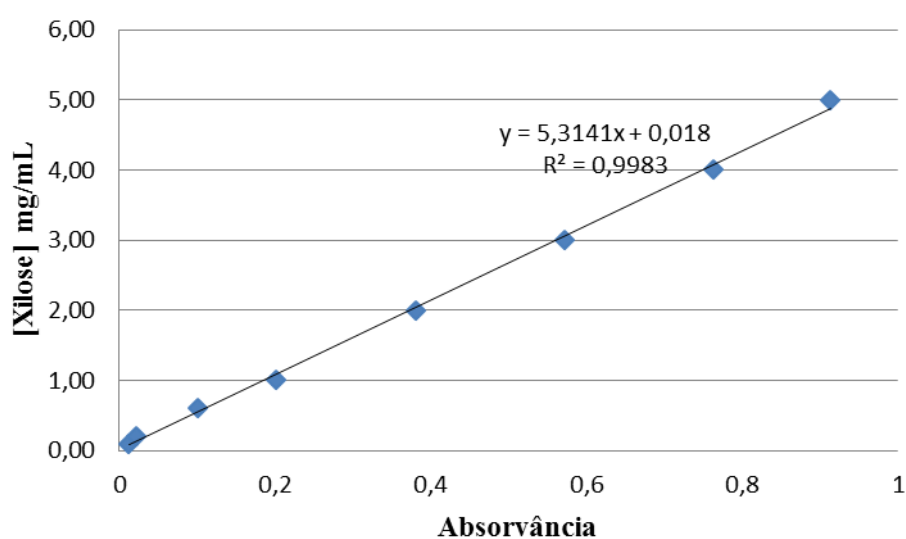


Figura 0.3. Curva de calibração 2.

- **Curva de calibração 3:**

A Tabela 0.9 apresenta os dados necessários à obtenção da curva de calibração representada na Figura 0.4.

Tabela 0-9. Quantidade necessária de xilose e de volume de tampão, e respectivas absorvâncias para a curva de calibração 3.

[Xilose] sol stock (mg/mL)	V stock (mL)	V tampão (mL)	[Xilose] (mg/mL)	Abs 540 nm		
				A	B	Média
5,07	0,1	0,4	1,01	0,21	0,21	0,209
	0,15	0,35	1,52	0,32	0,30	0,307
	0,2	0,3	2,03	0,42	0,41	0,414
	0,3	0,2	3,04	0,58	0,57	0,576

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

	0,4	0,1	4,06	0,79	0,77	0,782
	0,45	0,05	4,56	0,85	0,81	0,830
	0,5	0	5,07	0,96	0,96	0,958
0,507	0,1	0,4	0,10	0,02	0,03	0,025
1,014	0,1	0,4	0,20	0,04	0,04	0,043
	0,3	0,2	0,61	0,12	0,11	0,114

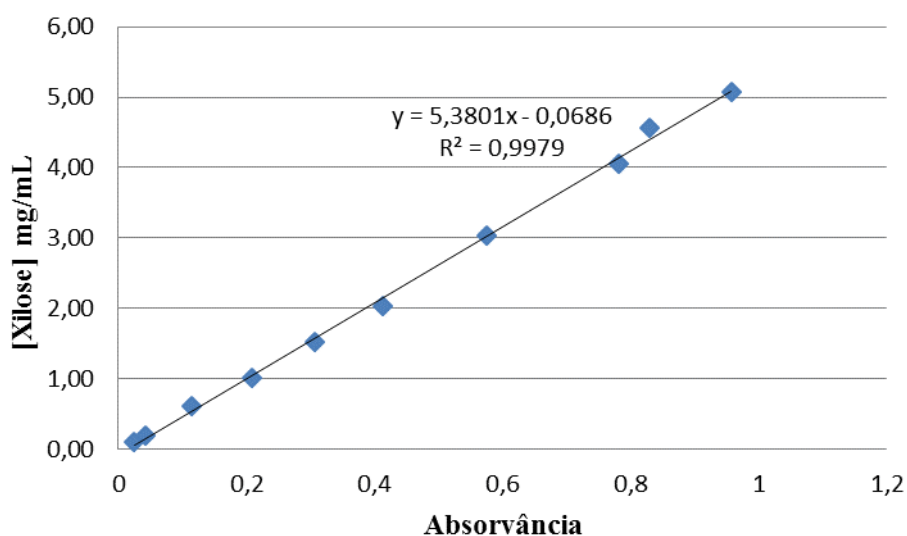


Figura 0.4. Curva de calibração 3.

I.4.7. Caracterização de Hidratos de Carbono via HPLC

A coluna opera a pH~5-6, pelo que o pH das amostras deve ser corrigido.

1. Transferir 10 mL de hidrolisado para um copo e adicionar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na forma sólida até a neutralização completa (medir pH com uma sonda). Utilizar uma vareta de vidro para garantir homogeneidade da mistura.
2. Uma vez que a neutralização é do tipo ácido forte – base forte, o pH após neutralização por excesso será muito elevado (11-12). Transferir a mistura para um tubo de ensaio e centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos.
3. Recolher cerca de 2,5 mL de sobrenadante. Destes, transferir cerca de 1,5 mL para um tubo de ensaio de boca larga, onde a sonda de pH possa ser inserida. Ajustar o pH para valores entre 5 e 6 com a adição de hidrolisado e sobrenadante, conforme necessário.

4. Filtrar a solução com o pH ajustado usando um filtro de 0,2 µm e proceder à injeção no HPLC.

NOTA:

Pode-se adicionar carbonato de cálcio em vez de hidróxido de cálcio.

De uma maneira geral, com a adição de carbonato de cálcio, consegue-se que o pH fique no intervalo pretendido, sem ser necessário voltar a acertá-lo.

Como para a injeção no HPLC são necessárias pequenas quantidades, em vez de se colocar na centrífuga, deixar assentar o sólido.

Na Tabela 0.10 encontram-se as especificações da coluna.

Tabela 0-10. Especificações para a análise das amostras por HPLC.

Coluna	HI PLEX ca
Pré-coluna	PL HI-PLEX ca
Temperatura do forno	80°C
Eluente	Água ultra-pura filtrada a vácuo (filtro 0,45 µm) e colocada nos ultra-sons (15min)
Caudal	0,6 mL/min

I.4.8. Determinação do Teor de Pentosanas – TAPPI T 223)

1. Pesar a quantidade de amostra de acordo com a Tabela 0.11 e colocar num balão de fundo redondo (250 mL). (Fazer em duplicado)

Tabela 0-11. Quantidade aproximada de matéria-prima a pesar (base OD).

	Hardwood	Softwood
Madeira	0,2–0,3 g	0,5–0,7g
Pasta crua	0,5–1 g	1–2 g
Pasta branqueada	2–3 g	3–5 g

2. Pesar cerca de 20g de NaCl e adicionar a cada balão.
3. Adicionar 100 mL de HCl (3,85N) a cada balão.
4. Colocar os balões em mantas de aquecimento e montar o sistema (Figura 0.5).

NOTA: a velocidade de aquecimento da manta deve ser ajustada de modo a que a destilação ocorra a uma velocidade de 2,5 mL/min.

5. Nos funis de carga (nos quais foram colocadas marcas de 25 em 25 mL) colocar 250 mL de HCl 3,85N.
6. Começar a contar o tempo quando começarem a aparecer as primeiras gotas de condensado.
7. Passados 5 minutos adicionam-se 25 mL de HCl 3,85N.
8. Passados mais 5 minutos adicionam-se mais 25 mL de HCl 3,85N, passando depois a adicionar-se de 10 em 10 minutos.
9. No final ($t=90 \pm 5$ min), antes de recolher o destilado, desligar as mantas e deixar a ebulição acalmar um pouco.
10. Recolher o destilado (225 ± 10 mL). Caso este não seja recolhido directamente num balão volumétrico de 250 mL, o destilado é transferido para este tipo de balão, lavando bem os balões que continham o destilado, com a solução de HCl 3,85N.
11. Para que a temperatura dos destilados seja aproximadamente 20°C, colocá-los num banho de água ~20°C durante 2 ou 3 min.
12. Juntar HCl 3,85N até à marca e agitar. Pipetar 5 mL de destilado para um balão volumétrico de 50 mL e adicionar 25 mL de orcinol, agitar e colocar num banho a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 60 minutos.
13. Adicionar etanol a 95% até à marca, agitar e voltar a colocar no banho.
14. Passados 60 minutos, aferir o etanol até à marca, agitar e medir a absorvância num espectrofotómetro, na região do visível, a 630 nm (branco: deve ser preparado, pipetando 5 mL de HCl 3,85N, em vez do destilado. No entanto verificou-se que a absorvância a 630 nm da água é idêntica, podendo utilizar-se água em vez de HCl).
15. Ler a massa de xilana presente na amostra a partir da curva de calibração.

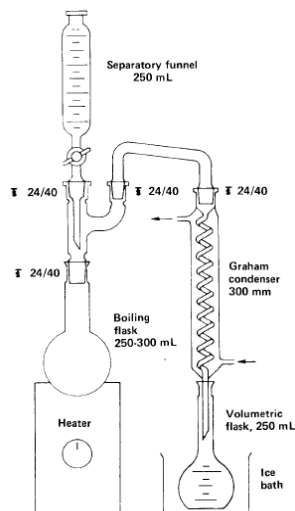


Figura 0.5. Montagem experimental.

Cálculo da percentagem de pentosanas:

$$\text{Pentosanas}(\%) = \frac{m_{xilana}(g)}{\text{massa}_{\text{amostra seca}}(g)} \times 100$$

Preparação das soluções de HCl (3,85 N) e de orcinol:

Solução de HCl (3,85 N):

- Diluir num balão volumétrico de 1000 mL, 315 mL de HCl concentrado (37%, densidade 1,18–1,19).
- Depois de preparar a solução é necessário aferir a sua concentração. Para isso titula-se a solução de HCl com hidróxido de sódio padronizado (1,0 N).

Solução de orcinol em HCl 11N:

- Diluir 915 mL de HCl concentrado num balão de 1000 mL.
- Pesar 0,4 g de orcinol ($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$) e 0,5 g de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e dissolvê-los em 1000 mL de HCl 11N (diluir 915 mL de HCl concentrado num balão de 1000mL).
- Guardar o reagente no frigorífico até duas semanas.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Construção da reta de calibração:

- Secar xilose pura a vácuo, a 60°C durante 2-4 horas. Utilizar diferentes massas: 10 mg até 100 mg.
- Colocar em balões de destilação e fazer a destilação como já foi descrito (passos 2 a 14).
- Fazer o gráfico (absorvância vs massa de xilose (mg)).

Reta de calibração usada: $xilose (mg) = 209,670 \times Absorvância + 0,659$ ($R^2 = 0,99937$)

- Calcular a massa de xilana: $xilana (mg) = xilose (mg) \times 0,88$. (o factor 0,88 corresponde a 132/150)

NOTA: A absorvância deve estar compreendida entre 0,1 e 0,8. Se as leituras estiverem fora deste intervalo, fazer nova leitura usando um volume maior ou menor de destilado (de 2 a 10 mL (V_c) em vez de 5 mL) e fazer a correção posterior da massa de xilana multiplicando por $V_c/5$.

ANEXO II. CONDIÇÕES E RESULTADOS EXPERIMENTAIS

II.1. Sequência ODE

Para uma observação mais detalhada, os valores de brancura ISO (%), brancura ISO após reversão (%), *PC number*, ganho de brancura, IK e viscosidade resultantes dos ensaios são apresentados na Tabela 0.12 e 0.13.

Tabela 0.12. Apresentação da brancura ISO, da reversão da brancura, do *PC number* e do ganho de brancura.

Ensaio	Carga Cl ₂ (% odp)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO após reversão (%)	<i>PC number</i>	Ganho de brancura
P1	0	53,34	52,39	1,2	-
LD1E	1,2	77,07	73,03	1,6	23,7
LD2E	1,5	79,30	75,19	1,4	25,96
LD3E	1,8	79,38	75,40	1,3	26,04
LD4E	2,2	81,69	78,48	0,9	28,4

Tabela 0-13. Valores detalhados de viscosidade e IK para as diferentes cargas de cloro ativo.

Ensaio	Carga Cl ₂ (% odp)	IK	Viscosidade (mL/g)
P1	0	10	1065
LD1E	1,2	5,38	771
LD2E	1,5	4,71	828
LD3E	1,8	4,36	828
LD4E	2,2	3,33	824

II.2. Sequência OXDE

Na Tabela 0.14 apresentam-se as condições e resultados obtidos para a sequência OXDE. Todos os ensaios aqui apresentados foram realizados a 88°C e com a pasta P1.

Tabela 0.14. Apresentação das condições e resultados obtidos para as sequências OXDE.

Ensaio	pH	Dose de enzima (kg/t odp)	Carga de Cl ₂ (% odp)	Teor de secura	IK	Média IK	Desvio padrão IK	Viscosidade	Média Viscosidade	Desvio padrão Viscosidade	Brancura ISO %	Brancura ISO após reversão%	PC number	Ganho de Brancura	Média Ganho Branc.
LX1DE		0,067	1,2	0,2196	3,0	3,13	0,18	850	849	1	81,7	79,2	0,7	28,4	28,1
LX1.1DE		0,067	1,2	0,2247	3,3			848			81,3	79,1	0,6	27,9	
LX2DE		0,134	1,2	0,2183	3,1	3,09	0,01	861	856	7	82,4	79,9	0,6	29,1	27,4
LX2.1DE		0,134	1,2	0,2184	3,1			851			82,4	80,3	0,5	25,8	
LX3DE	9	0,2	1,2	0,2079	2,9	2,97	0,06	828	850	30	83,2	81,1	0,5	29,9	29,7
LX3.1DE			0,2	1,2	0,2181			3,0			871	82,8	80,4	0,6	
LC1DE		0	1,2	0,2212	3,7	3,71	0,04	802	814	17	80,0	76,7	1,1	26,7	27,4
LC1.1DE		0	1,2	0,2234	3,7			826			80,0	76,8	1,0	26,6	
LC1.2DE		0	1,5	0,2394	3,2	3,15	0,02	850	847	4	81,6	78,7	0,8	28,3	28,2
LC1.3DE		0	1,5	0,2385	3,1			844			81,6	78,9	0,7	28,2	
LX4DE		0,2	1,2	0,2276	3,2	3,33	0,13	853	866	18	81,6	78,2	0,9	28,2	27,9
LX4.1DE		0,2	1,2	0,228	3,4			878			80,9	78,0	0,8	27,5	
LX5DE		0,134	1,2	0,225	3,5	3,55	0,06	870	869	2	79,6	76,5	1,0	26,3	26,3
LX5.1DE	9,5	0,134	1,2	0,2282	3,6			867			79,6	76,5	1,0	26,3	
LC4DE			0	1,2	0,2224	3,5	3,46	0,12	842	851	12	80,0	76,9	1,0	26,7
LC4.1DE		0	1,2	0,2208	3,4	859			79,9			76,9	0,9	26,6	
LC4.2DE		0	1,5	0,2318	3,1	3,12	0,01	851	855	5	81,5	78,3	0,9	28,2	28,3
LC4.3DE		0	1,5	0,2215	3,1			858			81,7	78,9	0,8	28,3	
LX6DE	10	0,134	1,2	0,2263	3,7	3,70	0,02	869	855	21	81,0	77,7	1,0	27,7	27,6

ANEXOS

LX6.1DE	0,134	1,2	0,2263	3,7			840			80,9	77,5	1,0	27,6	
LX7DE	0,2	1,2	0,2213	3,8			865			81,0	77,8	0,9	27,6	27,8
LX7.1DE	0,2	1,2	0,2295	3,6	3,67	0,11	874	870	6	81,3	77,8	1,0	27,9	
LC6DE	0	1,2	0,2285	3,7			861			80,3	76,9	1,0	26,9	
LC6.1DE	0	1,2	0,2315	3,8	3,74	0,11	887	874	18	80,0	76,4	1,1	26,7	26,8
LC6.2DE	0	1,5	0,2156	3,6			753			81,3	78,3	0,9	28,0	
LC6.3DE	0	1,5	0,2349	3,6	3,60	0,05	849	849	68	79,5	76,6	0,9	26,1	27,0
LX8DE	0,067	1,2	0,2311	3,1			836			82,8	79,6	0,8	29,5	
LX8.1DE	0,067	1,2	0,2215	3,1	3,08	0,01	821	829	11	82,5	79,9	0,7	29,1	29,3
LX9DE	0,2	1,2	0,2285	2,7			825			83,6	81,2	0,6	30,2	
LX9.1DE	0,2	1,2	0,2248	2,7	2,73	0,01	809	817	11	83,6	81,3	0,5	30,3	30,3
LC8DE	0	1,2	0,2468	3,9			812			78,9	75,4	1,2	25,5	
LC8.1DE	0	1,2	0,2284	3,9	3,92	0,04	822	817	7	78,7	75,3	1,2	25,4	25,5
LC8.2DE	0	1,5	0,2390	3,9			823			78,8	75,7	1,1	25,5	
LC8.3DE	0	1,5	0,2190	3,8	3,87	0,04	824	824	1	79,1	76,0	1,0	25,7	25,6

II.3. Rendimentos

Na Tabela 0.15 são apresentados detalhadamente os resultados obtidos no cálculo dos rendimentos, bem como os dados necessários à sua obtenção.

A massa de pasta seca inicial utilizada nos ensaios foi de 20,00g. Os ensaios foram realizados com pasta P2 e a temperatura do ensaio enzimático foi 88°C.

Tabela 0.15. Rendimentos obtidos após tratamento enzimático com xilanase X e sequência XDE.

Ensaio	pH	Dose enzima (kg/t)	m (pasta húmida) i (g)	teor de secura	m (pasta húmida) f (g)	Teor de secura	m (pasta seca) f (g)	Rend. (%)	Média (%)	Desvio padrão (%)	Perda de Rend. (%)*
Rend X1	9	0,134	82,78	0,2416	76,1294	0,2558	19,4770	97,4	97,8	0,5	2,6
Rend X2			82,78	0,2416	88,2761	0,2223	19,6232	98,1			
Rend C1		0	82,78	0,2416	98,5653	0,2037	20,0749	100,4	100	-	
Rend X5	8	0,067	81,18	0,2464	100,7681	0,1959	19,7397	98,7	99	0,4	1,4
Rend X6			81,18	0,2464	94,8233	0,2095	19,8613	99,3			
Rend X7	8	0,2	81,19	0,2464	128,3423	0,1502	19,2721	96,3	96	0,0	3,3
Rend X8			81,18	0,2464	114,0449	0,1690	19,2710	96,3			
Rend C7		0	81,18	0,2464	102,4159	0,1941	19,8820	99,4	100	0,4	
Rend C8			81,18	0,2464	162,4097	0,1231	19,9944	100,0			
Rend X9	10	0,134	81,17	0,2464	94,3554	0,2126	20,0629	100,3	100	0,5	0
Rend X10			81,17	0,2464	86,8521	0,2294	19,9267	99,6			
Rend C9		0	81,17	0,2464	89,8234	0,2219	19,9288	99,6	100	0,2	
Rend C10			81,17	0,2464	74,3574	0,2690	19,9986	100,0			
Rend X3DE	9	0,134	82,78	0,2416	84,9856	0,2231	18,9629	94,8	95	0,4	2,3
Rend X4DE			82,78	0,2416	85,5746	0,2231	19,0889	95,4			
Rend C3DE		0	82,78	0,2416	99,0873	0,1970	19,5232	97,6	97	0,3	
Rend C4DE			82,78	0,2416	92,5442	0,2101	19,4412	97,2			

*Perca de rendimento em relação ao controle; i=inicial; f=final.

II.4. Espectrometria UV

A Tabela 0.16 apresenta os valores obtidos, bem como as condições necessárias à realização de espectroscopia UV, efetuada de modo a verificar se a dose enzimática e o pH interferiam na deslenhificação das pastas. Estes ensaios foram medidos no espectrofotômetro UV com uma diluição de 1:50. Estes ensaios foram realizados com pasta P1.

Tabela 0.16. Apresentação das condições e resultados obtidos nos ensaios realizados de espectroscopia UV.

Ensaio	pH	Dose de enzima (kg/t odp)	pH residual	Abs 205 nm	Média Abs
LX1	9	0,067	8,81	0,422	0,462
LX1.1		0,067	8,82	0,502	
LX2		0,134	8,82	0,498	0,4515
LX2.1		0,134	8,82	0,405	
LX3		0,2	8,81	0,48	0,5125
LX3.1		0,2	8,81	0,545	
LC1.2		0	8,88	0,219	0,2135
LC1.3		0	8,89	0,208	
LX4		9,5	0,2	9,3	0,257
LX4.1	0,2		9,3	0,221	
LX5	0,134		9,38	0,19	0,210
LX5.1	0,134		9,38	0,229	
LC4	0		9,35	0,173	0,168
LC4.2	0		9,35	0,162	
LX6	10		0,134	9,87	0,111
LX6.1		0,134	9,87	0,17	
LX7		0,2	9,87	0,275	0,266
LX7.1		0,2	9,87	0,256	
LC6		0	10,28	0,148	0,153
LC6.1		0	10,19	0,157	
LX8		8	0,067	8,06	0,318
LX8.1	0,067		8,04	0,363	
LX9	0,2		7,98	0,4	0,420
LX9.1	0,2		8	0,439	
LC8	0		7,98	0,082	0,083
LC8.2	0		8,01	0,084	

II.5. Ácidos Hexenurónicos

Na Tabela 0.17 são apresentados os resultados obtidos na determinação dos ácidos hexenurónicos, bem como o IK e a lenhina total obtidos após a determinação dos HexA.

Tabela 0.17. Resultados experimentais obtidos para os ácidos hexenurónicos, bem como para o IK e lenhina total após determinação dos mesmos.

Ensaio	pH	Dose enzima (kg/t)	Pasta AD (g)	Secura	Pasta OD (g)	Absorvância		HexA (mmol/kg)	Média	Desvio Padrão	Diminuição de HexA* (%)	IK	IK(HexA)**	LT***
						260 nm	290 nm							
P2	-	-	0,1932	0,936 0,936	0,1808 0,1808	1,175 1,168	0,301 0,289	51,6 52,1	51,9	0,3	-	11,7	4,7	1,26
Rend X5		0,067	0,2029	0,9235	0,1874	1,188	0,289	51,5	51,4	0,2	0,15	-	4,6	-
Rend X6			0,2019	0,9244	0,1866	1,16	0,273	51,2						
Rend X1	9	0,134	0,2014	0,9336	0,1880	1,095	0,253	48,3	48,0	0,5	7,54	10	4,3	1,01
Rend X2				0,2007	0,9354	0,1877	1,072	0,244						
Rend C1		0	0,2022	0,9294	0,1879	1,167	0,273	51,3	51,4	0,2	0,87	11	4,6	1,14
Rend C2			0,2034	0,9235	0,1878	1,177	0,277	51,6						
Rend X7		0,2	0,2018	0,9418	0,1901	1,055	0,234	46,8	46,6	0,3	10,29	9,0	4,2	0,86
Rend X8	8		0,2033	0,9398	0,1911	1,051	0,233	46,4						
Rend C8		0	0,2060	0,9374	0,1931	1,228	0,294	52,0	-	-	-	10,9	4,7	1,11

*Diminuição de HexA em relação à pasta original (P2); ** $IK(HexA)=0,09 \times HexA$; *** $LT=(IK-0,09 \times HexA)/5,6$

II.6. Lenhina Solúvel e Lenhina Klason

Na Tabela 0.18 são apresentados os resultados obtidos na determinação da lenhina Klason, lenhina Solúvel e lenhina total, bem como os respectivos dados de suporte ao cálculo dos mesmos.

Tabela 0.18. Resultados obtidos para a lenhina Klason, lenhina solúvel e lenhina total.

Ensaio	Dose Enzima kg/t odp	Pasta AD (g)	Teor de secura	Pasta OD (g)	Lenhina Klason				Lenhina Solúvel							Lenhin a total (%)***	Lenhina total (%)****		
					Cadinh o (g)	C+KL OD (g)	KL OD (g)	KL (%)	Média KL (%)	Desv. Pad. (%)	FD	Abs (205 nm)	ASL (g/L)	Vf (mL)	ASL (%)			Média ASL (%)	Desv. Pad. (%)
Pasta P2		2,2037	0,936	2,0627	35,8601	35,8733	0,0132	0,64	0,61	0,04	3	0,481	0,0131	1420	0,90	0,88	0,03	1,49	1,49
		2,0993		1,9649	35,2432	35,2547	0,0115	0,59			3	0,431	0,0118	1440	0,86				
Rend X1*	0,134	2,2005	0,9336	2,0544	35,6414	35,6528	0,0114	0,55	0,50	0,08	1,5	0,575	0,0078	1475	0,56	0,56	0,00	1,06	1,04
Rend X2*		2,1767	0,9354	2,0361	34,9119	34,921	0,0091	0,45			1,5	0,565	0,0077	1490	0,56				
Rend C1*	0	2,1687	0,9294	2,0156	35,8641	35,8701	0,006	0,30	0,35	0,08	1,5	0,732	0,0100	1430	0,71	0,70	0,01	1,05	1,05
Rend C2*		2,2258	0,9235	2,0555	35,2365	35,2448	0,0083	0,40			1,5	0,719	0,0098	1455	0,69				
Rend X7**	0,2	2,1885	0,9418	2,0611	35,8606	35,8688	0,0082	0,40	0,41	0,02	1,5	0,663	0,0090	1440	0,63	0,64	0,01	1,05	1,01
Rend X8**		2,1815	0,9396	2,0497	35,2374	35,2462	0,0088	0,43			1,5	0,661	0,0090	1470	0,65				
Rend C7**	0	2,157	0,9303	2,0067	35,6387	35,6485	0,0098	0,49	0,37	0,17	3	0,374	0,0102	1450	0,74	0,74	0,00	1,11	1,11
Rend C8**		2,1653	0,9374	2,0298	34,9143	34,9194	0,0051	0,25			3	0,369	0,0101	1490	0,74				

*pH 9; **pH 8; ***Lenhina Total em base de pasta final (%); ****Lenhina Total em base de pasta inicial (%)

II.7. Caracterização dos Hidratos de Carbono

II.7.1. DNS

Os resultados para a concentração de xilose presente no filtrado obtido após tratamento enzimático da pasta, ou seja filtrado tal e qual, e para o filtrado tal qual sujeito a novo tratamento com xilanase X a 88°C, pH 8 durante duas horas, são apresentados na Tabela 0.19.

Tabela 0.19. Concentração de xilose presente no filtrado obtido após tratamento enzimático da pasta (filtrado tal e qual e novo filtrado sujeito a novo tratamento com xilanase X a 88°C e pH 8 durante 2 horas)

Ensaio	pH	Dose enzima (kg/t odp)	Filtrado tal e qual (Abs)		Média	[Xilose] mg/mL	Filtrado + Xilanase X (88°C, pH8, 2h) (Abs)		Média	FD	[Xilose] mg/mL	
Rend X1	9	0,134	0,059	0,056	0,058	0,235	0,037	0,025	0,032	1,316	0,124	
Rend X2		0,134	0,061	0,056			0,034	0,019				
Rend X5		0,067	0,019	0,014	0,014		0,009	0,016	0,016			
Rend X6		0,067	0,022	0,021			0,016	0,007				
Rend X7	8	0,2	0,206	0,193	0,209	1,053	0,167	0,171	0,173		1,126	
Rend X8		0,2	0,218	0,219			0,18	0,172				
Rend X9	10	0,134	0,018	0,014	0,019	0,021	0,003	0,001	0,005		-0,070	
Rend X10		0,134	0,015	0,027			0,008	0,007				
Rend X1	9	0,134	0,062	0,065	0,055	0,227	0,035	0,059	0,035		1,316	0,161
Rend X2		0,134	0,052	0,04			0,037	0,034				
Rend X5		0,067	0,027	0,036	0,036		0,013	0,024	0,024			
Rend X6		0,067	0,034	0,022			0,019	0,018				
Rend X7	8	0,2	0,207	0,192	0,206	1,040	0,145	0,157	0,157	1,022		
Rend X8		0,2	0,21	0,215			0,169	0,157				
Rend X9	10	0,134	0,003	0,003	0,004	-0,046	0,023	0,028	0,026	0,091		
Rend X10		0,134	0,008	0,002			0,032	0,019				

Na Tabela 0.20 são apresentados os resultados detalhados obtidos para os ensaios realizados com xilana padrão, antes e após adição de xilosidase BX.

Tabela 0.20. Xilose libertada pela BX aquando da utilização de xilana *oat spelts* e xilana *beechwood*.

Xilana	Antes BX				Após BX				FD	[Xilose] mg/mL	Xilose libertada pela BX
	Absorvância			[Xilose] mg/mL	Absorvância						
	A	B	Média		A	B	Média				
xilana <i>oat spelts</i>	0,045	0,042	0,044	0,157	0,02	0,011	0,016	10	0,050	-0,107	
xilana <i>oat spelts</i> (filtrada)	0,017	0,006	0,012	-0,017	0,016	0,01	0,013	10	-0,086	-0,069	
xilana <i>beechwood</i>	0,038	0,014	0,026	0,062	0,006	0,013	0,010	10	-0,275	-0,337	
xilana <i>beechwood</i> (filtrada)	0,036	0,012	0,024	0,051	0,005	0,021	0,013	10	-0,086	-0,137	

Na Tabela 0.21 são apresentados detalhadamente os resultados obtidos da concentração de xilose libertada pela xilosidase BX realizados na presença de xilana padrão e de duas xilanases, a xilanase X e a xilanase C. estes ensaios foram realizados a 88°C, pH 8 durante uma hora.

Tabela 0.21. Xilose libertada pela BX aquando da utilização de xilana *oat spelts* e xilana *beechwood* juntamente com duas xilanases distintas, a xilanase X e a xilanase C

Xilana + Xilanase	Antes BX				Após BX				FD	[Xilose] mg/mL	Xilose libertada pela BX
	Absorvância			FD	Absorvância						
	A	B	Média		A	B	Média				
xilana <i>oat spelts</i> + xilanase X	0,127	0,15	0,140	3,889	2,637	0,012	0,007	0,017	10	0,113	-2,524

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

	0,14	0,142			0,014	0,024			
xilana beechwood + xilanase X	0,134	0,134	0,137	2,585	0,014	0,011	0,012	-0,122	-2,706
	0,14	0,141			0,01	0,016			
xilana oat spelts + xilanase C	0,079	0,072	0,070	1,168	0,001	0,004	0,003	-0,655	-1,822
	0,064	0,065			0,002	0,003			
xilana beechwood + xilanase C	0,0138	0,0147	0,077	1,307	0,003	0,01	0,007	-0,393	-1,700
	0,129	0,149			0,003	0,009			

Na Tabela 0.22 são apresentados detalhadamente os resultados obtidos da concentração de xilose libertada pela xilosidase BX realizados na presença de xilana padrão e de duas xilanases, a xilanase X e a xilanase C. estes ensaios foram realizados a 50°C, pH 5 durante duas hora.

Tabela 0.22. Xilose libertada pela BX aquando da utilização de xilana *oat spelts* e xilana *beechwood* juntamente com duas xilanases distintas, a xilanase X e a xilanase C, desta vez submetidas a diferentes condições de operação.

Xilana + Xilanase	Antes BX				[Xilose] mg/mL	Após BX			FD	[Xilose] mg/mL	Xilose libertada pela BX
	Absorvância			FD		Absorvância					
	A	B	Média			A	B	Média			
xilana oat spelts + xilanase X	0,107	0,099	0,096		1,222	0,034	0,025	0,027		0,264	-0,958
	0,092	0,085				0,02	0,028				
xilana beechwood + xilanase X	0,126	0,119	0,113	2,778	1,477	0,035	0,021	0,027	4	0,264	-1,214
	0,101	0,105				0,022	0,029				
xilana oat spelts + xilanase C	0,101	0,099	0,101		1,293	0,021	0,015	0,028		0,285	-1,008
	0,107	0,095				0,03	0,045				
xilana beechwood + xilanase C	0,116	0,116	0,114		1,492	0,014	0,039	0,029		0,312	-1,180
	0,112	0,111				0,028	0,035				

II.7.2. HPLC

Na Tabela 0.23 são apresentados detalhadamente os resultados obtidos pelo método de HPLC.

Tabela 0.23. Açúcares detetados durante a realização do método de HPLC

Ensaio	pH	Dose enzima (kg/t odp)	Concentração, mg/mL*				% Libertada no branqueamento				Concentração mg/mL**			% Libertada ***			% açúcares libertados			
			Cel.	Glu.	Xil.	Galac.	Cel.	Glu.	Xil.	Galac.	Glu.	Xil.	Galac.	Glu.	Xil.	Galac.				
LX9		0,2										0,313								
LX9.1		0,2			0,81	0,346			0,729	0,297			1,375	0,474		1,158	0,284			
LC8		0			0,356	0,307							1,274	0,371						
LC8.2		0			0	0,238			0,160	0,245			0,000	0,450		0,826	0,248			
X-C	8	0,2			0,454	0,057	0	0,000	0,409	0,051			0,816	0,077	0	0,326	0,018		0,804	
LX8		0,067				0,288								0,000	0,464				0,276	
LX8.1		0,067				0,324								0,000	0,454					
LC8		0			0,356	0,307								1,274	0,371		0,506	0,248		
LC8.2		0				0,238			0,320	0,245				0,000	0,450					
X-C		0,067				0,034	0	0,000	0,000	0,030				-0,637	0,049	0	-0,573	0,014		0,044
LX4		0,2			0,819	0,263								0,355	0,425		-0,015	0,292		
LX4.1		0,2			0,902	0,277			0,774	0,243				1,349	0,439					
LC4	0			0,247	0,317								0,338	0,436		0,082	0,237			
LC4.2	0			0	0,25			0,111	0,255				0,000	0,395						
X-C	9,5	0,2			0,614	-0,0135	0	0,000	0,552	-0,012			0,683	0,017	0	0,062	0,028		0,642	
LX5		0,134	0,091			0,321								0,000	0,511				0,317	
LX5.1		0,134	0,091			0,31	0,082		0	0,284				0,000	0,472					
LC4		0			0,247	0,317								0,338	0,436		0,082	0,237		
LC4.2		0		0	0	0,25			0,111	0,255				0,000	0,395					
X-C		0,134				0,032			0,000	0,000	0,029			0,076	0	0,000	0,040			0,069

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigênio

X	0,134	4,707	4,707	0,35					5,571	5,571	0,483	1,801	1,801	0,335
X	0,134	4,05	4,05	0,292		3,941	3,941	0,289	5,187	5,187	0,532			
C	0	3,935	3,935	0,323					3,901	3,901	0,453			
C	0	3,411	3,411	0,265		3,306	3,306	0,265	4,528	4,528	0,486	0,975	0,975	0,315
X-C	0,134		0,7055	0,027	0	0,000	0,635	0,024		1,164	0,038	0,000	0,413	0,010
LX1	0,067			0,334					0		0,430			
LX1.1	0,067			0,298				0,284	0		0,489			0,259
C 9	0	3,935		0,323					3,901		0,453			
C	0	3,411		0,265		3,306		0,265	4,528		0,486	0,975		0,315
X-C	0,067			0,022	0	0,000	0,000	0,020			-0,009	0	0,000	-0,028
LX3	0,2			0,292					0		0,461			
LX3.1	0,2			0,309				0,270	0		0,520			0,341
C	0	3,935		0,323					3,901		0,453			
C	0	3,411		0,265		3,306		0,265	4,528		0,486	0,975		0,315
X-C	0,2		<0	0,0065	0	0,000		0,006			0,021	0		0,013
LX6	0,134			0,26							0,420			
LX6.1	0,134			0,19				0,203			0,333			0,272
LC6	0			0,22							0,447			
LC6.1	0			0,202				0,190			0,424			0,404
X-C 10	0,134		<0	0,014	0	0,000		0,013			-0,059	0		-0,066
LX7	0,2			0,195							0,299			
LX7.1	0,2			0,309				0,227			0,309			0,094
LC6	0			0,22							0,447			
LC6.1	0			0,202				0,190			0,424			0,404
X-C	0,2		<0	0,041	0	0,000		0,037			-0,132	0		-0,155

*Concentração de açúcar medida no cromatograma (mg/mL); **Concentração libertada no cromatograma após adição de xilanase X a 88°C, pH8 e 1hora; ***% libertada após adição de xilanase; Cel.=Celobiose; Glu.=Glucose; Xil.=Xilose; Galac.=Galactose;

II.8. Teor de Pentosanas

Os resultados obtidos para o teor de pentosanas presente na pasta, são apresentados na Tabela 0.24. Estes ensaios foram realizados com pasta P2 e com temperatura a 88°C.

Tabela 0.24. Teor de pentosanas presente na pasta.

Ensaio	pH	Dose enzim a kg/t odp	Pasta AD (g)	Teor de secura	Pasta OD (g)	Abs (630 nm)	Pentosanas (%)	Média	Rendimento (%)	Pentosanas (%)
Rend X1	9	0,134	1,0796	0,9336	1,0079	0,950	17,7	17,8	98	17,4
Rend X2			1,0471	0,9354	0,9795	0,985	17,9			
Rend X1			1,0796	0,9336	1,0079	0,796	18,3			
Rend X2			1,0471	0,9354	0,9794	0,772	18,3			
Rend C1		0	0,9165	0,9294	0,8518	0,921	20,0	19,7	100	19,7
Rend C2			1,1019	0,9235	1,0176	1,068	19,4			
Rend C1			0,9165	0,9294	0,8518	0,513	18,6			
Rend C2			1,1019	0,9235	1,0176	0,613	18,6			
P2	-	-	1,0784	0,9360	1,0094	1,037	19,0	19,2	-	19,2
			1,0676	0,9360	0,9993	1,046	19,4			
P2	-	-	1,0784	0,9360	1,0094	0,600	18,4	18,6		18,6
			1,0676	0,9360	0,9993	0,610	18,9			
Rend X7	8	0,2	0,6275	0,9418	0,5910	0,527	16,5	16,4	96	15,7
Rend X8			0,6267	0,9396	0,5889	0,516	16,3			
Rend C7		0	0,6255	0,9303	0,5819	0,592	18,9	18,8	100	18,8
Rend C8			0,638	0,9374	0,5980	0,603	18,7			

II.9. Poupança de reagentes

A Tabela 0.25 apresenta os dados necessários à construção dos gráficos que permitem calcular a poupança de reagentes de branqueamento. O estágio enzimático foi realizado a 88°C, e na extração alcalina foi utilizado 1,2% NaOH e 0,3% H₂O₂.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

Tabela 0.25. Apresentação das brancuras ISO, brancuras ISO após reversão, PC number e ganho de brancura.

Ensaio	pH	Dose de enzima (kg/t odp)	Carga Cl ₂ (% odp)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO após reversão (%)	PC number	Ganho de brancura	
LX1DE	9	0,067	1,2	81,7	79,2	0,7	28,4	
LX1.1DE				81,3	79,1	0,6	27,9	
LX2DE		0,134		82,4	79,9	0,6	29,1	
LX2.1DE				82,4	80,3	0,5	25,8	
LX3DE		0,2		83,2	81,1	0,5	29,9	
LX3.1DE		82,8		80,4	0,6	29,5		
LC1DE	9,5	0	1,5	80,0	76,7	1,1	26,7	
LC1.1DE				80,0	76,8	1,0	26,6	
LC1.2DE				81,6	78,7	0,8	28,3	
LC1.3DE		81,6		78,9	0,7	28,2		
LX4DE		0,2		1,2	81,6	78,2	0,9	28,2
LX4.1DE					80,9	78,0	0,8	27,5
LC4DE	0	80,0	76,9		1,0	26,7		
LC4.1DE		79,9	76,9	0,9	26,6			
LC4.2DE		81,5	78,3	0,9	28,2			
LC4.3DE		81,7	78,9	0,8	28,3			
LX6DE	10	0,134	1,2	81,0	77,7	1,0	27,7	
LX6.1DE				80,9	77,5	1,0	27,6	
LX7DE		0,2		81,0	77,8	0,9	27,6	
LX7.1DE				81,3	77,8	1,0	27,9	
LC6DE		0		80,3	76,9	1,0	26,9	
LC6.1DE				80,0	76,4	1,1	26,7	
LC6.2DE	81,3		78,3	0,9	28,0			
LC6.3DE	79,5		76,6	0,9	26,1			
LX8DE	8	0,067	1,2	82,8	79,6	0,8	29,5	
LX8.1DE				82,5	79,9	0,7	29,1	
LX9DE		0,2		83,6	81,2	0,6	30,2	
LX9.1DE				83,6	81,3	0,5	30,3	
LC8DE		0		78,9	75,4	1,2	25,5	
LC8.1DE				78,7	75,3	1,2	25,4	
LC8.2DE	78,8		75,7	1,1	25,5			
LC8.3DE	79,1		76,0	1,0	25,7			

À semelhança do que já foi apresentado para pH 8 na secção 5.4. Poupança de reagentes, aqui são apresentados os resultados obtidos graficamente para os restantes valores de pH.

A Figura 0.6 apresenta as curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO_2 para pH 9.

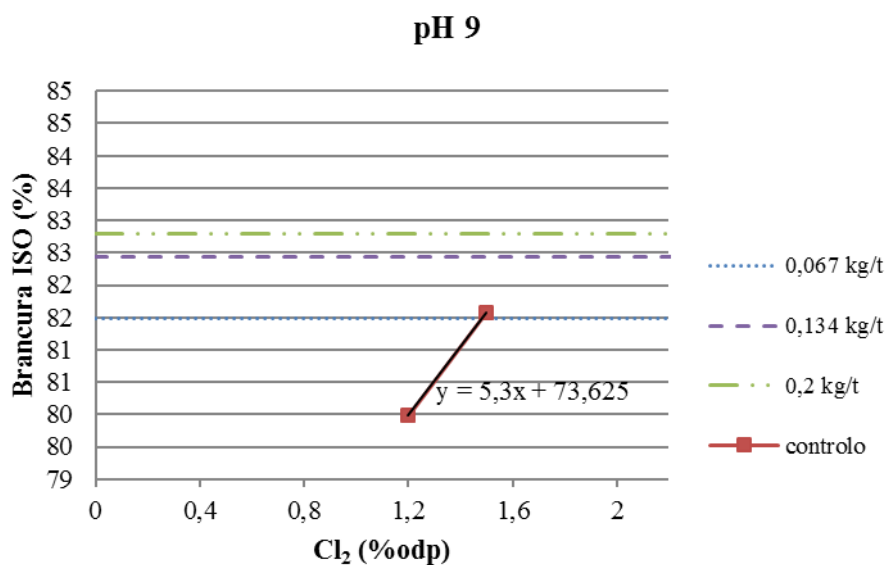


Figura 0.6. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO_2 , a pH 9.

Pela análise da Figura 0.6, podemos verificar que a poupança obtida para a menor carga de enzima (0,067 kg/t odp) é: **Poupança de $\text{ClO}_2 = \frac{1,48-1,2}{1,48} = 19\%$** ;

Para a carga de enzima de 0,134 kg/t odp é: **Poupança de $\text{ClO}_2 = \frac{1,66-1,2}{1,66} = 28\%$** ;

E para a maior carga de enzima (0,2 kg/t odp) é: **Poupança de $\text{ClO}_2 = \frac{1,73-1,2}{1,73} = 31\%$** .

Seguidamente, na Figura 0.7 estão representadas as curvas necessárias à obtenção da poupança de dióxido de cloro para pH 9,5.

Redução do consumo de reagentes de branqueamento por aplicação de tratamentos enzimáticos em pastas kraft pré-deslenhificadas com oxigénio

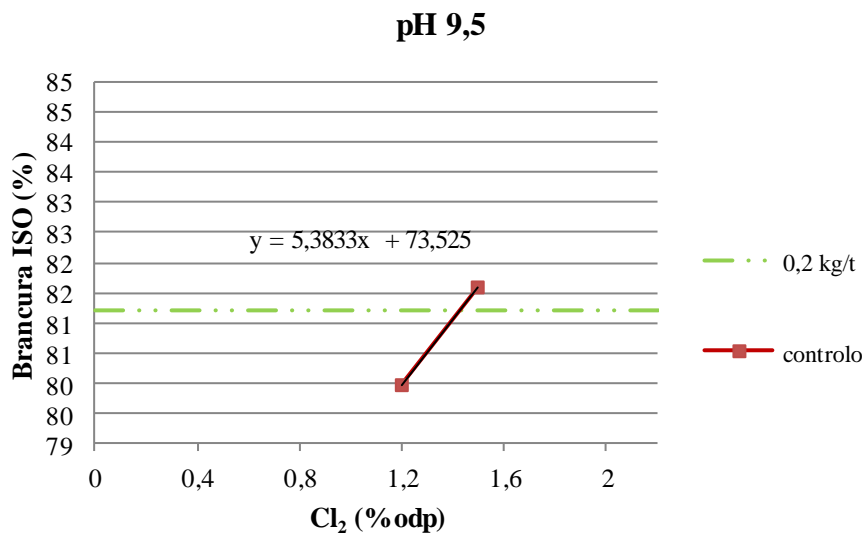


Figura 0.7. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO₂, a pH 9,5.

A poupança de reagentes obtida para pH 9,5, pela análise da Figura 0.7 é:

Para a maior carga de enzima (0,2 kg/t odp) é: $\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{1,43-1,2}{1,43} = 16\%$.

A Figura 0.8, contém as curvas necessárias à determinação da poupança de reagente ClO₂.

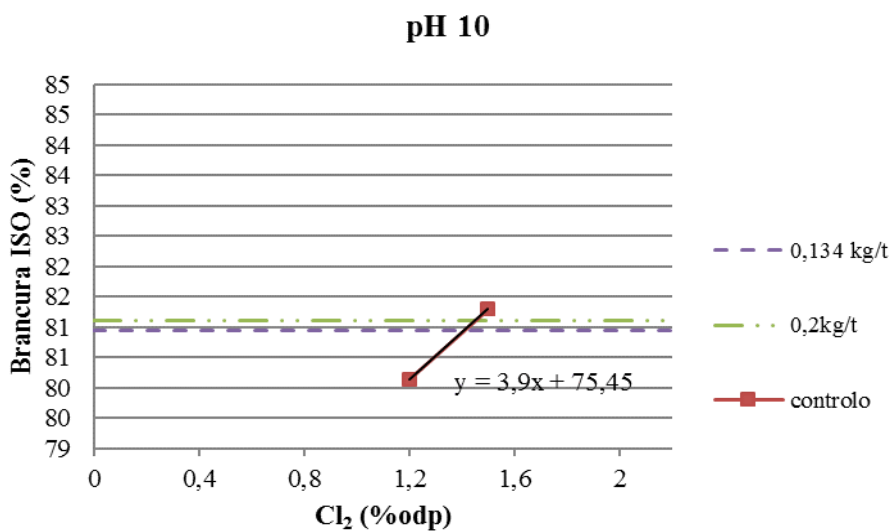


Figura 0.8. Representação das curvas necessárias à obtenção da poupança de reagente ClO₂, a pH 10.

Para pH 10, pela observação da figura, obtemos as seguintes poupanças de reagentes:

Para a carga de enzima de 0,134 kg/t odp: **Poupança de $\text{ClO}_2 = \frac{1,41-1,2}{1,41} = 15\%$** ;

Para a maior carga de enzima utilizada (0,2 kg/t odp): **Poupança de $\text{ClO}_2 = \frac{1,45-1,2}{1,45} = 17\%$** .