



**Ana Maria  
de Babo Martins**

Impacto da pre-extração no processo de desconstrução  
de casca de *E. globulus* visando a produção de  
polissacarídeos





**Ana Maria  
de Babo Martins**

**Impacto da pre-extração no processo de desconstrução  
de casca de *E. globulus* visando a produção de  
polissacarídeos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Paula Cristina de Oliveira Rodrigues Pinto do Instituto de Investigação da Floresta e Papel - RAIZ.



*"I was taught that the way of progress was neither swift nor easy."*

Marie Curie



**o júri**  
**presidente**

**Professor Doutor Carlos Manuel Santos da Silva**  
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Paula Cristina de Oliveira Rodrigues Pinto**  
Coordenadora de I&D Tecnológico do Instituto de Investigação da Floresta e Papel - RAIZ

**Professora Doutora Maria da Graça Videira Sousa Carvalho**  
Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra





## **agradecimentos**

Em primeiro lugar desejo agradecer ao Professor Doutor Armando Silvestre, pela orientação científica concedida e pelas correções a esta dissertação. Agradeço também à Doutora Paula Pinto pela excelente orientação científica, pelas correções a esta dissertação, por toda a transmissão de conhecimento, pelo otimismo e apoio concedido.

Ao Instituto de Investigação da Floresta e do Papel – RAIZ, pelo fornecimento da casca e pela disponibilização dos laboratórios, equipamentos e reagentes necessários para as caracterizações químicas, cozimentos e hidrólises enzimáticas. Agradeço o excelente acolhimento e todo o apoio prestado por todos os elementos, em particular à Doutora Sónia Pires pela transmissão de conhecimentos e pelo acompanhamento na realização das caracterizações químicas e à Mestre Cátia Almeida pelo apoio, amizade e disponibilidade e pelo acompanhamento na realização das hidrólises enzimáticas e na resolução dos problemas encontrados.

À Mestre Teresa Franco e à Doutora Ivone Oliveira agradeço a amizade, as palavras de ânimo e de coragem e a boa disposição transmitida diariamente.

Aos meus amigos, em especial à Paula Vieira, cuja amizade, companheirismo e apoio incondicional foram vitais para o meu sucesso nesta etapa.

Aos meus pais, irmãos e à minha avó, por acreditarem sempre em mim e no meu potencial, pelas oportunidades que me proporcionaram, pelo apoio inabalável, pelo amor incondicional e pela compreensão.

Para finalizar, agradeço ao Valter que ao longo desta etapa se tornou forçosamente um pouco engenheiro químico. Agradeço porque acreditou em mim quando eu não acreditava, por ser um bom ouvinte e por me incentivar a fazer sempre mais e melhor.



## palavras-chave

*Eucalyptus globulus*, casca, pré-tratamento, pré-extração, cozimento kraft, polissacarídeos

## resumo

A biomassa florestal, como a casca de *Eucalyptus globulus*, é um sub-produto da indústria da pasta de papel cuja única utilização atual é a produção de energia. No entanto, devido à sua abundância e composição química que inclui maioritariamente polissacarídeos (essencialmente celulose e hemiceluloses) e lenhina, a casca tem vindo a ser estudada para a obtenção de frações ricas em polissacarídeos que têm diversas finalidades, como a sua conversão em soluções de açúcares simples. Contudo é necessário submeter os materiais lenhocelulósicos a pré-tratamentos ou desconstrução para melhorar o acesso dos polissacarídeos às enzimas, na hidrólise enzimática.

A casca de *E. globulus* difere da madeira da mesma espécie essencialmente no seu elevado teor de extratáveis polares, nomeadamente compostos fenólicos, e material inorgânico. Estudos anteriores indicam que o cozimento kraft da casca requer condições de operação mais severas para atingir um grau de deslenhificação semelhante ao do cozimento da madeira. Verificaram-se também limitações à hidrólise enzimática da pasta de casca que não se encontram no caso da pasta de madeira da mesma espécie.

O objetivo deste trabalho foi estudar o impacto da pré-extração da casca de *E. globulus*, segundo duas abordagens diferentes (uma com mistura etanol/água e outra com água), na desconstrução deste material lenhocelulósico por cozimento kraft e na hidrólise enzimática da pasta resultante, favorecendo a sua conversão em açúcares simples.

Na pré-extração com etanol/água 81,5% dos extratáveis em etanol/tolueno presentes na casca foram removidos, enquanto que na abordagem com água removeram-se apenas 14,3%. Verificou-se que a pré-extração, em ambos os meios, não afetou significativamente o impacto do cozimento kraft nos polissacarídeos. No entanto, em termos da produção de açúcares simples, a hidrólise enzimática da pasta de casca previamente extraída com etanol/água produziu a solução final de açúcares mais concentrada, com 47,7 mg/mL, bem como a maior quantidade de açúcares redutores, 39,1 g, de entre as sequências de valorização estudadas. Esta pasta também apresentou a maior percentagem de conversão de polissacarídeos em açúcares, 71,7%, seguida da pasta de casca previamente extraída com água, 62,3%, relativamente à pasta de casca tal e qual, 50,8%, indicando que a pré-extração beneficia o processo de sacarificação.

O balanço de massa global a cada sequência de valorização, permitiu concluir que a pré-extração com etanol/água, a 83°C durante 264 minutos, seguida de cozimento kraft, com fator H 1114 e alcalinidade de 22%, apresenta o maior potencial de produção de açúcares, de cerca de 33 000 ton/ano considerando uma produção anual de casca de 100 000 ton numa fábrica de média dimensão.



**keywords**

*Eucalyptus globulus*, bark, pre-treatment, pre-extraction, kraft pulping, polysaccharides

**abstract**

Forest biomass, like *Eucalyptus globulus* bark, is a by-product of the pulp and paper industry whose current singular use is energy production. However, due to its availability and chemical composition, which includes mostly polysaccharides (essentially hemicelluloses and cellulose) and lignin, bark has been the subject of many studies regarding the production of polysaccharides enriched fractions that have many applications, like its conversion into simple sugar solutions. However, it's necessary that the lignocellulosic materials undergo pre-treatments or deconstruction processes to improve the polysaccharides access towards the enzymes, in enzymatic hydrolysis.

The *E. globulus* bark differs from wood due to its high content of polar extractives, mainly phenolic compounds, and inorganic material. Previous studies show that bark's kraft pulping requires more severe pulping conditions in order to achieve the same degree of delignification as the *E. globulus* wood kraft pulping. There were also reported limitations in bark's enzymatic hydrolysis that weren't found in wood.

The purpose of this work was to study the impact of *E. globulus* bark pre-extraction, with two different approaches (with the mixture of ethanol/water and with water), in its deconstruction by kraft pulping and in the enzymatic hydrolysis of the resulting pulp, benefitting its conversing into simple sugars.

Regarding the removal of extractives during the pre-extraction, using ethanol/water 81,5% of the ethanol/toluene extractives in *E. globulus* bark were removed, while using water the removal of extractives was only 14,3%. In relation to kraft pulping it was noticed that the pre-extraction, in both approaches, didn't have a significant impact on the removal of polysaccharides during pulping. However, regarding the production of simple sugars, the enzymatic hydrolysis of ethanol/water extracted bark pulp produced the most concentrated sugar solution, with 47,7 mg/mL, as well as the biggest quantity of reducing sugars, 39,1 mg, from among the studied valorisation sequences. In this way, the ethanol/water extracted bark pulp had the highest conversion of polysaccharides into sugars, 71,7%, followed by the water extracted bark pulp, 62,3%, in relation to the initial bark pulp, 50,8%, indicating that the pre-extraction benefits the scarification process.

Through the global mass balance of each process sequence it was concluded that the ethanol/water pre-extraction, at 83°C for 264 minutes, followed by kraft pulping, with an H factor of 1114 and 22% active alkali, presents the highest sugar production, of about 33 000 tons/year, assuming an annual production of 100 000 tons of bark by a medium-sized industry.



# Índice

Índice.....	xv
Índice de Figuras .....	xix
Índice de Tabelas.....	xxiii
Abreviaturas e Simbologias .....	xxv
<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
1.1. A indústria de pasta e papel e a sua matéria-prima .....	3
1.2. Composição química da madeira e da casca de <i>E. globulus</i> .....	5
1.2.1. Compostos extratáveis.....	7
1.2.1.1. Compostos lipofílicos.....	7
1.2.1.2. Compostos fenólicos .....	9
1.2.2. Celulose.....	10
1.2.3. Hemiceluloses .....	12
1.2.4. Lenhina.....	13
1.3. Produção de soluções de açúcares.....	15
1.3.1. Pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos .....	16
1.3.1.1. Pré-tratamento físico .....	17
1.3.1.2. Pré-tratamento físico-químico.....	17
a) Pré-tratamento com água líquida sobreaquecida.....	17
b) Pré-tratamento por explosão a vapor.....	18
1.3.1.3. Pré-tratamento químico .....	18
a) Pré-tratamento ácido .....	18
b) Pré-tratamento organossolve .....	19
c) Pré-tratamento por cozimento kraft.....	19
i. Breve descrição do processo de cozimento kraft .....	20
ii. Reações da lenhina no processo de cozimento kraft .....	22
iii. Reações dos polissacarídeos no processo de cozimento kraft.....	24
1.3.2. Pré-extração de compostos fenólicos .....	25
1.4. Tratamento enzimático de materiais lenhocelulósicos .....	26
1.5. Objetivos do trabalho .....	29
<b>Capítulo 2 - Materiais e Métodos.....</b>	<b>31</b>
2.1. Caracterização química sumária da casca e da pasta de <i>E. globulus</i> .....	31
2.1.1. Preparação da amostra para análise.....	31
2.1.2. Metodologia analítica.....	32
2.1.2.1. Humidade .....	32

2.1.2.2.	Cinzas .....	32
2.1.2.3.	Extratáveis em etanol/tolueno .....	32
2.1.2.4.	Lenhina Klason e lenhina solúvel .....	32
2.1.2.5.	Pentosanas .....	34
2.2.	Extração da casca de <i>E. globulus</i> .....	35
2.3.	Cozimento kraft da casca de <i>E. globulus</i> .....	35
2.3.1.	Determinação do índice kappa da pasta .....	37
2.4.	Tratamento enzimático das pastas de casca tal e qual e de casca extraída.....	38
2.4.1.	Medição da atividade enzimática .....	38
2.4.2.	Hidrólise enzimática das pastas.....	39
2.4.3.	Método de análise dos açúcares redutores .....	40
<b>Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de resultados .....</b>		<b>41</b>
3.1.	Caracterização química da casca e da madeira de <i>E. globulus</i> .....	41
3.2.	Extração da casca de <i>E. globulus</i> .....	43
3.3.	Cozimento kraft da casca de <i>E. globulus</i> .....	45
3.3.1.	Avaliação do desempenho da casca tal e qual no cozimento kraft.....	46
3.3.2.	Avaliação do desempenho da casca extraída no cozimento kraft .....	47
3.3.3.	Caracterização química sumária das pastas de casca tal e qual e de casca extraída.	50
3.4.	Tratamento enzimático das pastas de casca tal e qual e de casca extraída.....	53
3.5.	Balanco global ao processo .....	57
<b>Capítulo 4 - Conclusão.....</b>		<b>61</b>
<b>Bibliografia .....</b>		<b>65</b>
<b>Apêndices .....</b>		<b>69</b>
A.	Figuras Auxiliares .....	69
A.1.	Reações da lenhina no processo de cozimento kraft .....	69
A.2.	Reações dos polissacarídeos no processo de cozimento kraft .....	71
B.	Exemplos de cálculo.....	72
B.1.	Elaboração da curva de calibração das pentosanas.....	72
B.2.	Cálculos para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática .....	72
B.3.	Cálculo da concentração da solução de açúcares redutores.....	75
B.4.	Determinação da atividade enzimática de Cellic Ctec 2.....	75
B.5.	Cálculo da conversão de açúcares redutores .....	77
B.6.	Cálculo das frações removidas na pré-extração e no cozimento kraft.....	80
B.6.1.	Cálculo da fração removida na pré-extração da casca de <i>E. globulus</i> .....	80
B.6.2.	Cálculo da fração removida no cozimento de casca tal e qual e de casca extraída ...	81
B.7.	Cálculos do balanço de massa global .....	82
C.	Tabelas e Figuras Auxiliares .....	86



C.1. Resultados da hidrólise enzimática.....	86
C.1.1. Volume de Cellic Ctec 2 e volume final de hidrolisado .....	86
C.1.2. Conversão, concentração e massa de açúcares redutores .....	86
C.2. Resultados do cálculo da fração removida na pré-extração e no cozimento kraft.....	88
C.3. Representação gráfica do rendimento depurado em função do teor de lenhina total nas pastas .....	90



## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Distribuição da área de povoamento florestal por espécie dominante, em Portugal continental [16].	4
Figura 1.2 – Esquema geral da composição da biomassa de <i>E. globulus</i> . Adaptado de [24].	5
Figura 1.3 – Ácidos triterpénicos presentes na fração externa da casca de <i>E. globulus</i> : (1) Ácido betulínico; (2) Ácido ursólico; (3) Ácido oleanólico. Adaptado de [35].	8
Figura 1.4 – Triterpenóides e esteróis presentes na fração interna da casca de <i>E. globulus</i> : (4) $\beta$ -sitosterol; (5) $\beta$ -amirina. Adaptado de [35].	8
Figura 1.5 – Ácidos gordos predominantes na fração interna da casca de <i>E. globulus</i> : (6) Ácido palmítico; (7) Ácido linoléico; (8) Ácido oléico.	9
Figura 1.6 – Principais compostos fenólicos presentes na casca de <i>E. globulus</i> : (1) Ácido elágico; (2) Ácido gálico; (3) Ácido protocatecuico; (4) Eriodictiol; (5) Taxifolina.	9
Figura 1.7 – Estrutura de um elagitanino (6) e de um galotanino (7).	10
Figura 1.8 – Estrutura química da celulose. Adaptado de [38].	10
Figura 1.9 – Ligações por pontes de hidrogénio intramoleculares e intermoleculares na estrutura da celulose [38].	11
Figura 1.10 - Representação esquemática da organização da celulose nas fibras da madeira: A - corte das fibras da madeira; B – fração da fibra formada por microfibrilas; C – Microfibrilas; D – Microfibrilas; E – Fibrila Elementar; F – Célula unitária; G – Unidade de celobiose. Adaptado de [38].	12
Figura 1.11 – Estrutura química parcial de uma <i>O</i> -acetil-4- <i>O</i> -metilglucoronoxilana. Adaptado de [8].	13
Figura 1.12 – Fórmula abreviada de glucuronoxilana de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. Adaptado de [42].	13
Figura 1.13 – Fração representativa da estrutura da lenhina de faia ( <i>Fagus sylvatica</i> ) e das principais ligações entre unidade de fenilpropano: (1) $\beta$ -O-4; (2) $\beta$ - $\beta$ '; (3) 5-5'; (4) $\alpha$ -O-4; (5) $\beta$ -5. Adaptado de [43].	14
Figura 1.14 – Estruturas químicas dos precursores da lenhina: (1) Álcool cumarílico; (2) Álcool coniferílico; (3) Álcool sinapílico. Adaptado de [8].	14
Figura 1.15 – Mecanismo do processo de hidrólise enzimática da celulose. Adaptado de [67].	27
Figura 2.1 – Esquema do trabalho experimental realizado.	31
Figura 2.2 – Curva de calibração para o calculo do teor de pentosanas.	34
Figura 2.3 – Operações de cozimento, lavagem e crivagem das pastas kraft.	36
Figura 2.4 – Montagem para a hidrólise enzimática da pasta.	39

Figura 2.5 – Curva de calibração da glucose pelo método DNS.....	40
Figura 3.1 - Representação gráfica do rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) versus o índice kappa (IK) das pastas de casca tal e qual obtidas para diferentes cargas alcalinas (22%, 24%, 26% e 28%) e fatores H (2983 e 1114).....	47
Figura 3.2 - Representação gráfica do rendimento depurado ( $\eta_{dep}$ ) e do índice kappa (IK) das pastas de casca extraída com etanol/água, com água e de casca tal e qual obtidas para cargas alcalinas de 22% e 24% e fator H 1114. ....	49
Figura 3.3 - Concentração de açúcares redutores ( $C_{AR}$ ) presentes no hidrolisado das pastas de madeira, de casca tal e qual, de casca extraída com etanol/água e da casca extraída com água. ....	54
Figura 3.4 - Conversão de açúcares redutores ( $x$ ) ao longo da hidrólise enzimática de pasta de madeira, de casca tal e qual, de casca extraída com etanol/água e de casca extraída com água. ....	55
Figura 3.5 – Diagrama do processo de cozimento kraft de casca tal e qual de <i>E. globulus</i> seguido de hidrólise enzimática. ....	57
Figura 3.6 - Diagrama da sequência de pré-extração com etanol/água da casca de <i>E. globulus</i> e cozimento kraft, seguido de hidrólise enzimática. ....	58
Figura 3.7 - Diagrama da sequência de pré-extração com água da casca de <i>E. globulus</i> e cozimento kraft seguido de hidrólise enzimática.....	58
Figura A. 1 - Formação do intermediário derivado quinona (I) por clivagem da ligação $\alpha$ -O-4 em unidades fenólicas. Adaptado de [24].....	69
Figura A. 2 - Mecanismo de clivagem das ligações $\beta$ -O-4 entre unidade fenólicas em meio alcalino. Adaptado de [24].....	69
Figura A. 3 - Mecanismo da clivagem das ligações $\beta$ -O-4 entre unidades não-fenólicas. Adaptado de [24]. ....	70
Figura A. 4 - Clivagem de uma ligação carbono-carbono, libertando formaldeído. Adaptado de [24]. ....	70
Figura A. 5 - Reação de condensação da lenhina: formação de uma ligação $\alpha$ -1. ....	70
Figura A. 6 - Reação de degradação dos polissacarídeos em meio alcalino: A- reação de <i>peeling</i> ; B- Reação de <i>stopping</i> . Adaptado de [24].....	71
Figura B. 1 – Representação gráfica da massa de glucose ( $m_{Glc}$ ) em função do quociente entre o volume de Cellic Ctec 2 e o volume de solução. ....	76
Figura B. 2 - Fração de extratáveis em etanol/tolueno, lenhina total, pentosanas e celulose* removida na extração da casca com etanol/água e na extração com água, face à casca tal e qual. ....	81
Figura B. 3 - Fração de extratáveis em etanol/tolueno, lenhina total, pentosanas e celulose* removidas no cozimento kraft de casca extraída e de casca tal e qual.....	82
Figura B. 4- Diagrama genérico para o balanço de massa a cada sequência de valorização. ....	82

Figura C. 1 – Representação gráfica do rendimento depurado ( $\eta_{dep}$ ) em função do teor de lenhina total nas pastas de casca tal e qual, pastas de casca extraída com etanol/água e pastas de casca extraída com água.....90



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Produção anual de subprodutos florestais (cálculos com base em dados de 2014)......	4
Tabela 1.2 – Caracterização química sumária da casca de <i>E. globulus</i> [12, 13, 22, 25]......	6
Tabela 1.3 – Terminologia associado ao cozimento kraft. Adaptado de [40]......	20
Tabela 1.4 – Principais reações da lenhina e dos polissacarídeos durante o cozimento kraft. Adaptado de [38, 64]......	23
Tabela 2.1 – Condições de operação para as extrações de casca em diferentes meios. ....	35
Tabela 2.2 – Condições do cozimento da casca tal e qual e da casca extraída em etanol/água e em água. ....	36
Tabela 3.1 – Caracterização química sumária da casca tal e qual e da madeira de <i>E. globulus</i> e intervalos referência de cada parâmetro.....	42
Tabela 3.2 – Caracterização química sumária da casca de <i>E. globulus</i> tal e qual e da casca extraída com etanol/água e com água. ....	44
Tabela 3.3 – Índice kappa ( <i>IK</i> ), rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) e teor de incozidos secos resultantes do cozimento de casca tal e qual com fatores H 2983 e 1114.....	46
Tabela 3.4 – Índice kappa ( <i>IK</i> ), rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) e teor de incozidos secos resultantes do cozimento da casca extraída com etanol/água e com água, com fator H 1114 e alcalinidades 22% e 24%.....	48
Tabela 3.5 - Caracterização química sumária da pasta de casca tal e qual e das pastas de casca extraída.....	50
Tabela B. 1 - Humidade da pasta de madeira, casca tal e qual e casca extraída utilizadas na hidrólise enzimática.....	73
Tabela C. 1 – Volume de Cellic Ctec 2 utilizado em cada ensaio e volume final de hidrolisado obtido em cada ensaio.....	86
Tabela C. 2 – Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de madeira. ....	86
Tabela C. 3 - Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca tal e qual. ....	87
Tabela C. 4 - Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca extraída com etanol/água. ....	87
Tabela C. 5 - Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca extraída com água. .	88
Tabela C. 6 – Composição química da casca extraída com etanol/água e da casca extraída com água recalculada para a base de massa inicial de casca. ....	88
Tabela C. 7 – Fração removida de cada componente da casca (% $R_P$ ) na pré-extração com etanol/água e na pré-extração com água.....	89

Tabela C. 8 - Composição química da pasta de casca tal e qual recalculada para base de massa inicial de casca, e da pasta de casca extraída com etanol/água e com água recalculada para a base de massa de casca extraída. ....	89
Tabela C. 9 - Fração removida (%R <sub>p</sub> ) de cada componente da casca extraída com etanol/água, da casca extraída com água e da casca tal e qual no cozimento kraft. ....	90



## Abreviaturas e Simbologias

<b>AA</b>	<i>Alcali</i> Ativo (%)
<b>AE</b>	Atividade enzimática (FPU/mL <sub>enzima</sub> )
<b>Abs<sub>540 nm</sub></b>	Absorvância a 540 nm
<b>Abs<sub>630 nm</sub></b>	Absorvância a 630 nm
<b>AR</b>	Açúcares redutores
<b>b</b>	Ordenada na origem de uma reta
<b>C<sub>AR</sub></b>	Concentração de açúcares redutores (mg/mL)
<b>CE</b>	Carga enzimática (FPU/g <sub>HC</sub> )
<b>C<sub>Glucose</sub></b>	Concentração de glucose (mg/mL)
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
<b>FD</b>	Fator de diluição
<b>FPU</b>	Filter Paper Units
<b>G</b>	Unidades do tipo guiacilo
<b>H</b>	Unidades do tipo p-hidroxifenilo
<b>HM</b>	Hidromódulo
<b>IK</b>	Índice kappa
<b>Incozidos</b>	Teor de incozidos (%)
<b>L<sub>sol</sub></b>	Lenhina solúvel
<b>LT</b>	Lenhina total
<b>m</b>	Declive de uma reta
<b>m<sub>AR</sub></b>	Massa de açúcares redutores (ton/ano)
<b>m<sub>casca a. s.</sub></b>	Massa de casca tal e qual absolutamente seca (g)
<b>m<sub>casca_ext a.s.</sub></b>	Massa seca de casca extraída absolutamente seca (g)
<b>m<sub>extrato</sub></b>	Massa de extrato (g)

$m_{GAE}$	Massa de equivalentes em ácido gálico (g)
$m_{Glc,pasta}$	Massa de glucose na pasta (ton/ano)
$m_{madeira\ a.s.}$	Massa de madeira absolutamente seca (g)
$m_{matéria\ prima}$	Massa de matéria prima (kg)
$m_{pasta\ a.s.}$	Massa seca de pasta absolutamente seca (g)
$m_{Pentosanas}$	Massa de pentosanas (mg)
$m_{PS,casca\ ext}$	Massa de polissacarídeos na casca extraída (ton/ano)
$m_{PS,coz}$	Massa de polissacarídeos removidos no cozimento kraft (ton/ano)
$m_{PS,ext}$	Massa de polissacarídeos removidos na extração (ton/ano)
$m_{PS,pasta}$	Massa de polissacarídeos na pasta (ton/ano)
$m_{Xil,pasta}$	Massa de xilose na pasta (ton/ano)
$R_{PS, ext}$	Fração de polissacarídeos removidos na pré-extração (%)
$R_{PS, coz}$	Fração de polissacarídeos removidos no cozimento (%)
$R^2$	Coefficiente de correlação
$S$	Unidades do tipo seringilo
$t$	Tempo (h)
$T_{patamar}$	Temperatura de patamar (°C)
$V_{licor}$	Volume de licor de cozimento (L)
$x$	Conversão (%)
$\eta_{dep}$	Rendimento depurado em pasta (%)

## Introdução

A elevada dependência da sociedade atual dos recursos fósseis para produção de energia, combustíveis, produtos químicos e materiais, tem vindo a gerar debate e preocupação a nível económico e ambiental, reconhecendo-se a necessidade de encontrar alternativas renováveis para estes recursos [1]. Por este motivo, recursos biológicos renováveis, como os materiais lenhocelulósicos, têm vindo a despertar interesse como possível matéria-prima da bioindústria, que enquadra a produção de produtos de origem renovável [2, 3]. De entre os materiais lenhocelulósicos utilizados destaca-se a biomassa florestal devido à sua abundância e composição química favorável [4, 5].

O crescimento rápido da espécie *Eucalyptus globulus*, a vasta plantação desta espécie em território nacional e a sua composição química, levaram a que seja a principal matéria-prima da indústria da pasta de papel [6]. A biomassa florestal remanescente do corte das plantações para a produção de pasta de papel, em especial a casca de *E. globulus*, é atualmente integrada nesta indústria unicamente para produção energética. Contudo, este sub-produto da indústria compreende na sua composição celulose, hemiceluloses e lenhina, sendo um material lenhoso abundante e disponível a preço baixo. Por estes motivos têm vindo a ser estudadas cadeias de valor acrescentado para a casca de *E. globulus*, partindo do seu fracionamento, por processos de pré-tratamento ou desconstrução, para obter frações ricas em polissacarídeos que apresentam diversas finalidades dentro da bioindústria e da bioeconomia, nomeadamente a produção de soluções de açúcares simples [4, 5].

O cozimento kraft é uma das tecnologias de pré-tratamento mais comuns. Neste processo, a lenhina é removida quase na totalidade e parte dos polissacarídeos presentes são também solubilizados [5, 7]. Esta tecnologia encontra-se implementado a nível industrial para produção de pasta de papel, tornando apelativa a sua integração num contexto de biorefinaria de forma a utilizar e otimizar a exploração da biomassa florestal para a produção de soluções de açúcares [7, 9]. A conversão da fração sólida rica em polissacarídeos, resultante do pré-tratamento da casca por cozimento kraft, em soluções de açúcares é realizada por sacarificação, nomeadamente por hidrólise enzimática.

Os estudos realizados anteriormente para a caracterização da composição química da madeira e da casca de *E. globulus* permitiram constatar que uma das diferenças entre os dois materiais lenhocelulósicos é o teor de extratáveis uma vez que estes compostos, em especial de natureza fenólica, são consideravelmente mais abundantes na casca [10, 12, 13]. Na literatura é também reportado que a casca de *E. globulus* requer condições de operação mais severas no seu cozimento kraft, como maior alcalinidade, para atingir o mesmo grau de deslenhificação do cozimento de

madeira da mesma espécie. Verificou-se também que, na hidrólise enzimática da pasta de casca, a conversão de polissacarídeos em açúcares simples é bastante inferior à obtido na hidrólise de outros subprodutos florestais e da madeira [11, 12]. A presença extratáveis na casca poderá ser responsável pela maior necessidade de alcalinidade para atingir o mesmo grau de deslenhificação no cozimento kraft, bem como pela inibição da sacarificação condicionando a conversão dos polissacarídeos em açúcares simples [11].

Assim, este trabalho tem como objetivo estudar o impacto da pré-extração da casca de *E. globulus*, segundo duas abordagens diferentes (uma com mistura etanol/água e outra com água), na desconstrução deste material lenhocelulósico por cozimento kraft e na hidrólise enzimática da pasta resultante, favorecendo a sua conversão em açúcares simples. Desta forma, pretende-se selecionar a combinação das condições processuais da pré-extração e do cozimento kraft que beneficiam a conversão de polissacarídeos em açúcares simples.

O presente trabalho está estruturado em quatro capítulos. O primeiro capítulo de revisão bibliográfica, onde se pretende enquadrar o tema da dissertação e facilitar a análise e a discussão dos resultados obtidos. No segundo capítulo descrevem-se os materiais e os procedimentos experimentais seguidos para a obtenção de resultados. No terceiro capítulo são apresentados e analisados os resultados experimentais obtidos. Por fim, no último capítulo encontram-se as principais conclusões do trabalho realizado e algumas perspetivas de trabalho futuro.

## Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

### 1.1. A indústria de pasta e papel e a sua matéria-prima

A indústria de pasta e papel abrange um conjunto de entidades cuja atividade abrange quase todo o ciclo de vida dos produtos de papel, desde a produção florestal até ao tratamento dos produtos em fim de vida, passando pela etapa chave da produção de pasta de papel e a sua conversão em diferentes tipos de papel. Este setor, representa cerca de 8% da produção industrial nacional e 5% do total das exportações portuguesas de mercadorias e bens, tratando-se de um setor predominantemente exportador [16].

Em 1957 a Companhia Portuguesa de Celulose, em Cacia, começou a utilizar madeira de eucalipto para produzir pasta de papel, tornando Portugal o impulsionador da aplicação do cozimento kraft ao eucalipto para produção de pasta [6]. Aplicando esta tecnologia à madeira de *Eucalyptus globulus* cultivada em Portugal produziram-se pastas celulósicas de elevada qualidade e aptidão papelreira, que são comercialmente competitivas com pastas produzidas a partir de madeira de outras espécies, justificando a elevada procura da pasta de *E. globulus* no mercado e tornando esta espécie na principal matéria-prima na indústria papelreira a nível nacional [6, 8, 13, 16]. Atualmente, a The Navigator Company lidera a produção de papel de impressão a nível europeu e é uma das maiores produtoras de pasta de eucalipto a nível mundial, fabricando pastas de elevada qualidade escolhidas pelas empresas líder na indústria para fabrico de papeis nos segmentos de impressão e escrita [17].

A espécie *Eucalyptus globulus*, é uma espécie florestal de folhas planas e largas, tratando-se de uma árvore de grande porte que pode chegar a alturas entre 40 e 50 m [6]. O crescimento rápido do *E. globulus* é fortemente influenciado pela disponibilidade de água e nutrientes minerais no solo, uma vez que a razão de crescimento das árvores é em parte determinada pela densidade do fluxo de nutrientes do solo para as raízes [18].

A evolução da área florestal de eucalipto está diretamente relacionada com a capacidade desta espécie se desenvolver em regiões de clima temperado, potenciando o seu uso industrial e comercial. A floresta portuguesa ocupa 3,2 milhões de hectares, sabendo-se que 31% desta é ocupada por espécies resinosas e os restantes 61% por espécies folhosas [16]. A The Navigator Company é a maior produtora florestal privada em Portugal, gerindo 120 mil hectares de floresta certificada, em que 73% são plantação de *E. globulus* [19].

O eucalipto é a espécie florestal que ocupa a maior área em Portugal continental, com 812 mil hectares correspondentes a 25,8% da floresta portuguesa, seguido pelo sobreiro e pelo pinheiro bravo (Figura 1.1) [16].

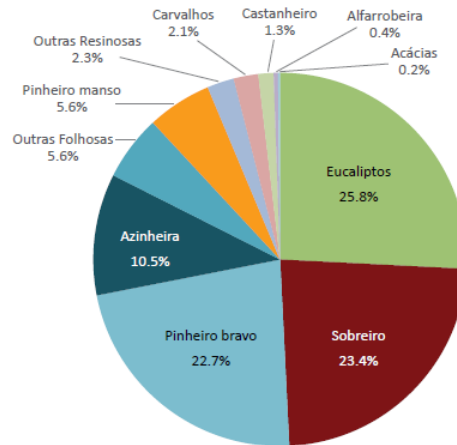


Figura 1.1 - Distribuição da área de povoamento florestal por espécie dominante, em Portugal continental [16].

No processamento da madeira a indústria de pasta de papel gera uma elevada quantidade de subprodutos florestais, desde casca, ramos, folhas e outros tipos de biomassa florestal, que não são utilizados no processo tradicional de produção de pasta mas que, devido ao seu valor energético, são geralmente queimados para produção de energia [12, 13, 21]. Na unidade de produção o descasque dos troncos de madeira é a primeira operação e gera elevadas quantidade de casca, uma vez que esta representa entre 11% a 14% do peso seco de um tronco [21, 31]. Atualmente, além do seu aproveitamento como biocombustível sólido, a casca tem também despertado interesse para a sua utilização na produção de outros produtos de valor acrescentado, desde produtos químicos, materiais e biocombustíveis, que tiram partido da sua composição química específica [5, 20].

Na Tabela 1.1 encontram-se descritas as quantidades anuais de casca, ramos e folhas resultantes do abate de eucaliptos por parte das empresas associadas da CELPA – Associação da indústria papelreira.

Tabela 1.1 – Produção anual de subprodutos florestais (cálculos com base em dados de 2014).

<b>Material</b>	<b>CELPA (2014)</b>
Casca (ton)	330 000
Folhas (ton)	330 000
Ramos (ton)	480 000
Total (ton)	1 140 000

## 1.2. Composição química da madeira e da casca de *E. globulus*

De uma forma geral, a composição da casca de *E. globulus* engloba componentes estruturais e componentes não-estruturais à semelhança da madeira (Figura 1.2). Os componentes estruturais são os polímeros que constituem a parede celular dos materiais vegetais: celulose, hemiceluloses e lenhina; enquanto que os componentes não-estruturais são compostos orgânicos e inorgânicos de baixo peso molecular e menos abundantes, que apresentam estruturas químicas muito variadas [22, 23]. Os compostos orgânicos são designados por extratáveis, devido à facilidade com que são extraídos da biomassa com solventes orgânicos e água, e incluem compostos fenólicos, triterpénicos e alifáticos; quanto aos compostos inorgânicos, são predominantemente sais metálicos e designam-se genericamente por cinzas [24].

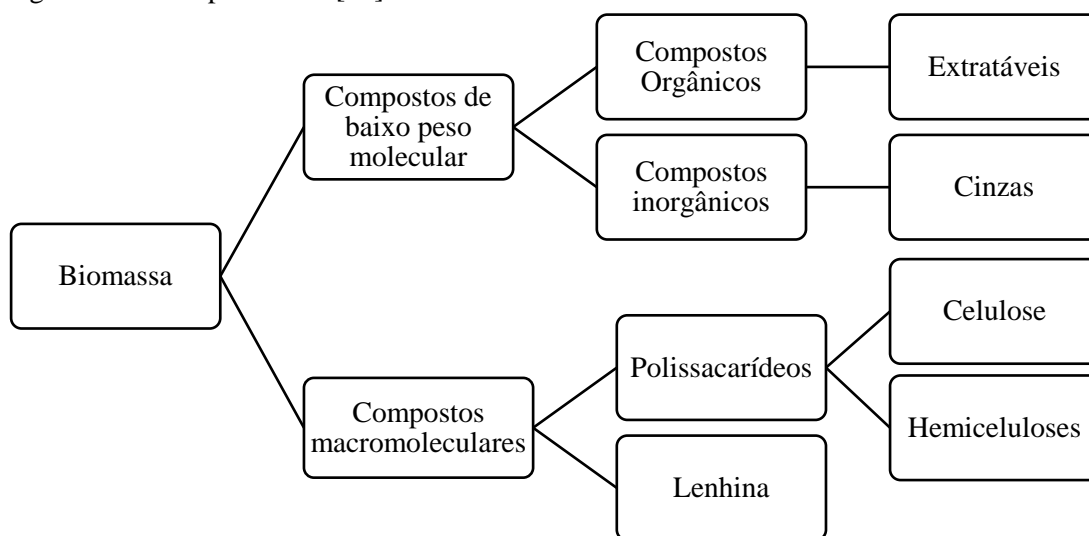


Figura 1.2 – Esquema geral da composição da biomassa de *E. globulus*. Adaptado de [24].

A composição química da biomassa lenhocelulósica apresenta variações significativas com a zona morfológica da árvore, a sua origem geográfica, o clima e as condições do solo, tornando difícil especificar uma composição química bem definida para a madeira e casca de *E. globulus* [25]. Por este motivo existem diferenças significativas entre as percentagens de compostos macromoleculares, extratáveis e cinzas recolhidas de diferentes fontes bibliográficas [12, 13, 22, 25].

Na Tabela 1.2 encontra-se descrita a composição química sumária da casca de *E. globulus*. Para além dos teores de compostos macromoleculares e de extratáveis e cinzas, esta Tabela inclui também a solubilidade em NaOH 1%, parâmetro que é utilizado para estimar a quantidade de compostos fenólicos presentes, uma vez que este meio é propício à remoção de compostos polares, em especial compostos fenólicos simples e taninos, podendo também remover uma fração da lenhina de menor peso molecular, bem como oligo e polissacarídeos. Torna-se ainda necessário esclarecer o

significado de um dos parâmetros apresentados, as pentosanas, que representam a fração das hemiceluloses compostas por resíduos de pentoses (especialmente xilose).

Tabela 1.2 – Caracterização química sumária da casca de *E. globulus* [12, 13, 22, 25].

<b>Parâmetro</b>	<b>% m/m<sub>casca</sub></b>
Celulose	51,1 – 56,0
Pentosanas	14,6 – 23,7
Lenhina	16,9* [18,3 - 34,1]
Cinzas	2,1 – 12,1
<b>Extratáveis polares</b>	
etanol	0,6 – 1,3
água	4,1 – 4,5
<b>Extratáveis apolares</b>	
diclorometano	0,6
<b>Solubilidade</b>	
NaOH 1%	19,9 – 21,1

\*Teor de lenhina Klason

A análise dos dados apresentados na Tabela 1.2 mostra que na composição química da casca os compostos macromoleculares são a fração mais abundante. Destaca-se também que a quantidade de extratáveis solúveis em água é superior à quantidade solúvel em etanol e à quantidade solúvel em diclorometano, indicando que o teor de extratáveis polares na casca é superior ao teor de extratáveis apolares.

Sistematizando a informação sobre a composição química da madeira de *E. globulus* verifica-se que: o teor de lenhina se encontra entre 17,8% [13] e 24,8% [26], o teor de celulose entre 54% [25] e 56,9% [13] e o teor de pentosanas entre 20,2% [25] e 21,7% [13]. Em relação aos extratáveis verifica-se que o teor de extratáveis polares, que é compreendido entre 0,2% [25] e 3,4% [26], é superior ao teor de extratáveis apolares, que se encontra entre 0,4% [26] e 1,5% [13]. A solubilidade da madeira em NaOH 1% encontra-se entre 12,2% [13] e 17,4% [26] e o teor de cinzas está compreendido entre 0,5% [25] e 1,0% [13].

Comparativamente à madeira de *E. globulus*, a casca contém maior quantidade de lenhina e cinzas, quantidades de celulose inferiores e pentosanas em quantidades semelhantes. O teor de extratáveis na casca é superior ao da madeira, especialmente no que concerne aos extratáveis polares. A fração da casca solúvel em meio alcalino é também superior ao valor encontrado na madeira, confirmando que a casca é rica em compostos polares, principalmente de natureza fenólica [10, 15].



### 1.2.1. Compostos extratáveis

Os extratáveis são compostos de baixo peso molecular, solúveis em água ou em solventes orgânicos como etanol, metanol e diclorometano [24]. A composição dos extratáveis varia consideravelmente entre famílias e gêneros de árvores, tratando-se de uma mistura complexa de compostos de estrutura química diversa. Estes compostos podem ser divididos em três subgrupos: compostos alifáticos (maioritariamente gorduras e ceras), terpenos e terpenóides e compostos fenólicos [23, 24].

O conteúdo total de extratáveis na casca de *E. globulus* pode ser dividido em duas frações: a fração lipofílica, extraída com solventes apolares, e a fração fenólica, extraída com solventes polares. A diversidade de compostos extratáveis e da sua estrutura química levam a que um solvente isolado não seja capaz de dissolver todos estes compostos, por isso são estudados solventes com diferentes polaridades e as características do seu extrato [25, 26].

Os compostos extratáveis presentes nos materiais lenhocelulósicos contribuem para características como cor e odor e afetam propriedades físicas como a elasticidade e a permeabilidade [27]. Estes compostos têm um efeito indesejado em muitas das aplicações tecnológicas da madeira e dos subprodutos florestais, como é o caso da produção de pasta de papel pois reagem rapidamente com os reagentes de cozimento (hidróxido de sódio e sulfureto de sódio) reduzindo a quantidade dos mesmos disponível para o processo em si e formam manchas escuras na pasta e no papel (*pitch*) [27–29].

No entanto, os extratáveis, em particular aqueles presentes na casca de *E. globulus*, podem ser também uma fonte de valorização uma vez que, tanto a sua fração fenólica como a sua fração lipofílica, podem ser exploradas em aplicações de valor acrescentado, integrando a indústria da pasta de papel num contexto de biorefinaria [14, 21, 28, 29]. Dada a abundância de ácidos triterpénicos e compostos fenólicos na casca de *E. globulus*, a viabilidade da sua exploração tem vindo a ser alvo de estudo, uma vez que estes são compostos conhecidos pela sua atividade biológica nomeadamente anti-oxidante, anti-inflamatória e antitumoral, que pode ser aplicada na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar [25, 28, 29, 31].

#### 1.2.1.1. Compostos lipofílicos

Os compostos lipofílicos presentes na casca de *E. globulus* são geralmente extraídos com solventes apolares como o diclorometano e os principais componentes do extrato são ácidos triterpénicos, esteróis, ácidos gordos e álcoois de cadeia longa [26, 31].

Na literatura existente o estudo das famílias de compostos lipofílicos mostra diferenças significativas entre a fração externa e a fração interna da casca, verificando-se que a fração externa

apresenta um teor de extratáveis lipofílicos cerca de nove vezes superior ao teor na fração interna e que a composição desta última se assemelha à composição da madeira de *E. globulus* [35].

O extrato da fração externa da casca é rico em ácidos triterpênicos como ácido betulínico, ursólico e oleanólico (Figura 1.3), cujas quantidades são 283,8 mg/kg (de biomassa seca), 934,2 mg/kg e 363,4 mg/kg, respetivamente [34].

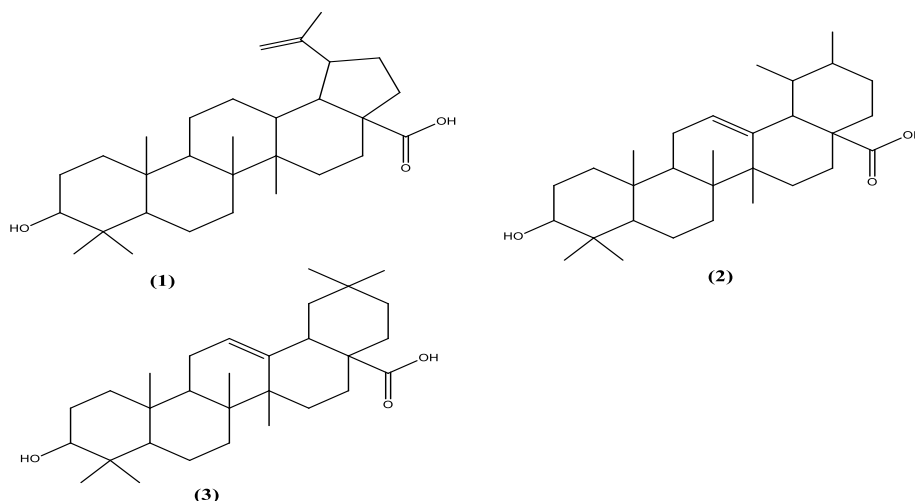


Figura 1.3 – Ácidos triterpênicos presentes na fração externa da casca de *E. globulus*: (1) Ácido betulínico; (2) Ácido ursólico; (3) Ácido oleanólico. Adaptado de [35].

Na casca externa identificaram-se ainda pequenas quantidades de:  $\beta$ -sitosterol, sendo este o único esteroide presente nesta fração; ácidos gordos, como os ácidos octadecanóico, docosanóico, tetracosanóico, hexacosanóico, hexadecanóico (ou palmítico), linoléico e oléico; e álcoois de cadeia longa, como docosanol, o tetracosanol, o hexacosanol e o octacosanol [32, 35].

Na fração interna da casca os componentes predominantes são esteróis e triterpenóides ( $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -amirina - Figura 1.4), e os ácidos gordos de cadeia longa, como os ácidos palmítico, linoléico e oleico (Figura 1.5) [35]. Embora nesta fração não se encontrem ácidos triterpênicos, verifica-se que a presença de ácidos gordos e álcoois de cadeia longa em ambas as frações. Foram ainda detetadas pequenas quantidades de diversos  $\alpha$  e  $\omega$ -hidroxiácidos tanto na fração interna como na externa e ainda ácido cumárico e ésteres de ácido ferúlico na fração externa da casca [25, 26, 31, 28].

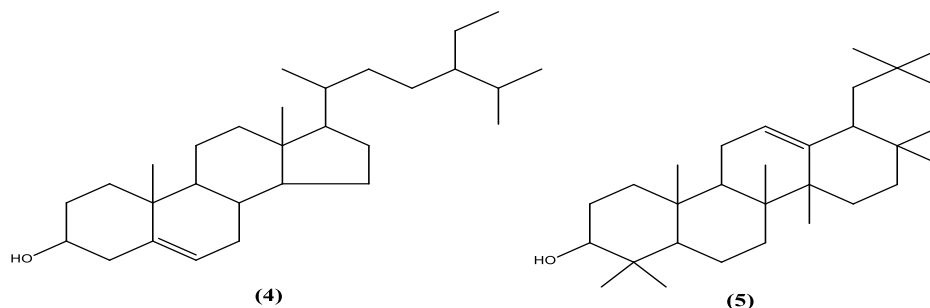


Figura 1.4 – Triterpenóides e esteróis presentes na fração interna da casca de *E. globulus*: (4)  $\beta$ -sitosterol; (5)  $\beta$ -amirina. Adaptado de [35].

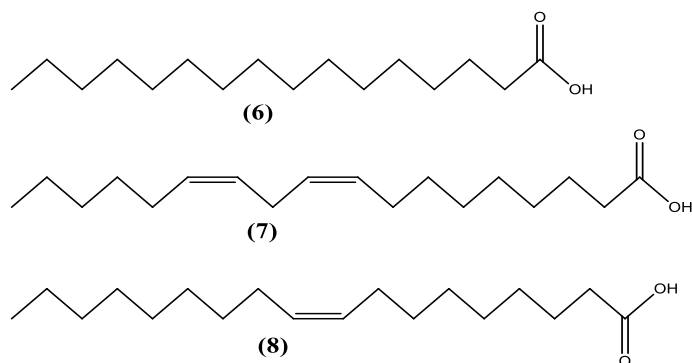


Figura 1.5 – Ácidos gordos predominantes na fração interna da casca de *E. globulus*: (6) Ácido palmítico; (7) Ácido linoléico; (8) Ácido oléico.

### 1.2.1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes na casca de *E. globulus* dividem-se em diferentes famílias, nomeadamente ácidos fenólicos, aldeídos correspondentes e flavonóides, bem como compostos de peso molecular mais elevado como os taninos condensados, ou proantocianidinas, e os taninos hidrolisáveis, ou elagitaninos [21, 29, 30]. Devido à sua estrutura predominantemente polar estes compostos são extraídos utilizando solventes polares como misturas do tipo etanol/água e metanol/água, ou apenas água, constituindo o extrato polar da casca [15]. O teor de compostos fenólicos na casca de *E. globulus* foi determinado em 32,4 mg/g sendo consideravelmente superior ao teor na madeira da mesma espécie, 9,4 mg/g [37].

De entre o vasto conjunto de componentes detetados no extrato polar da casca de *E. globulus*, verifica-se que os ácidos fenólicos e os elagitaninos são os compostos mais abundantes [14, 30]. O ácido elágico é o ácido fenólico mais abundante, reportando-se também ácido gálico e ácido protocatecuico (Figura 1.6) em concentrações moderadas no extrato. Nesta fração encontram-se também flavonóides em concentrações moderadas, como é o caso do eriodictiol e da taxifolina (Figura 1.6) [14].

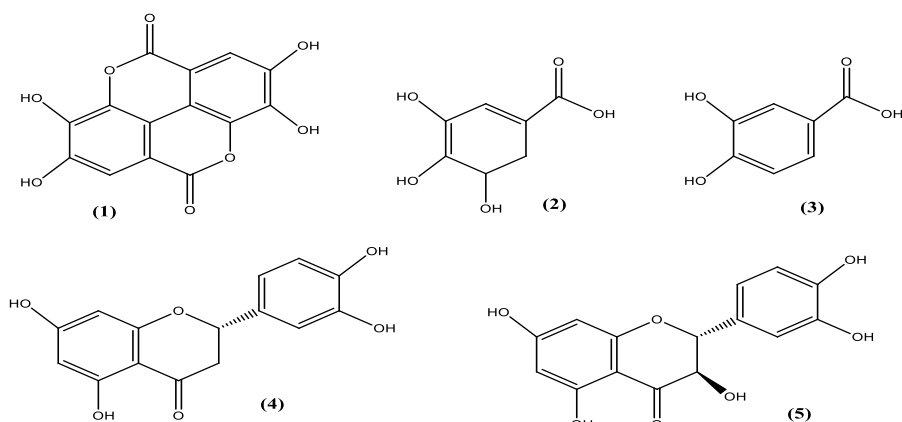


Figura 1.6 – Principais compostos fenólicos presentes na casca de *E. globulus*: (1) Ácido elágico; (2) Ácido gálico; (3) Ácido protocatecuico; (4) Eriodictiol; (5) Taxifolina.

Os elagitaninos integram a família dos taninos hidrolisáveis e encontram-se bastante concentrados e com elevada variedade na casca *E. globulus*, sendo constituídos por glucose como núcleo central ligado a unidade de ácido hexa-hidroxi-difênico que, devido à desidratação espontânea, é isolado como ácido elágico (Figura 1.7) [15]. Na literatura é também descrita a presença de galotaninos no extrato da casca, sendo este um outro sub-grupo da família dos taninos hidrolisáveis [37]. A estrutura desta classe de taninos assemelha-se à dos elagitaninos pois ambos têm glucose como núcleo central, ainda que o galotaninos possuam ligações a unidades de ácido gálico ou derivados (Figura 1.7) [15].

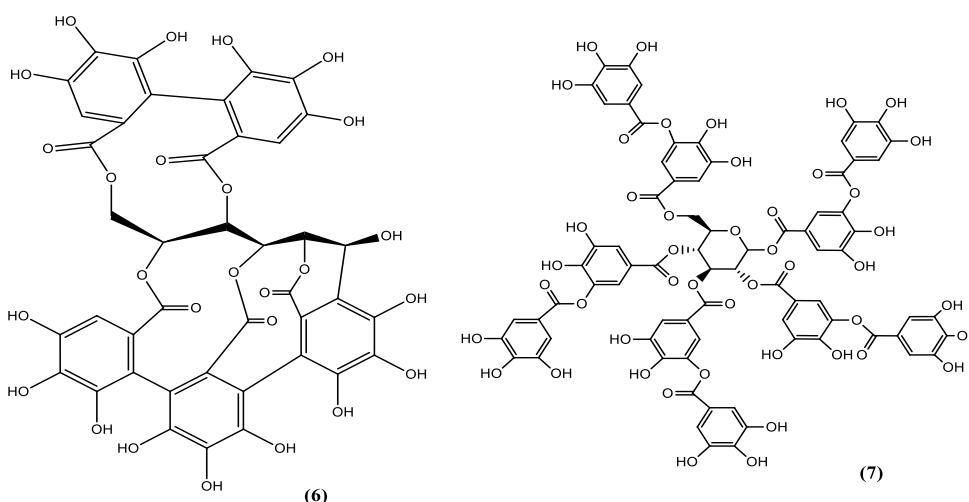


Figura 1.7 – Estrutura de um elagitanino (6) e de um galotanino (7).

### 1.2.2. Celulose

A celulose é o componente mais abundante nas paredes celulares das plantas. Trata-se de um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose com grau de polimerização até 10000, que se encontram ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ .

Duas unidades adjacentes de  $\beta$ -D-glucopiranosose formam uma ligação glicosídica por eliminação de uma molécula de água entre os grupos hidroxilo do carbono 1 e do carbono 4 originando a unidade de repetição da cadeia de celulose, a celobiose [34, 35]. A estrutura química da celulose encontra-se na Figura 1.8.

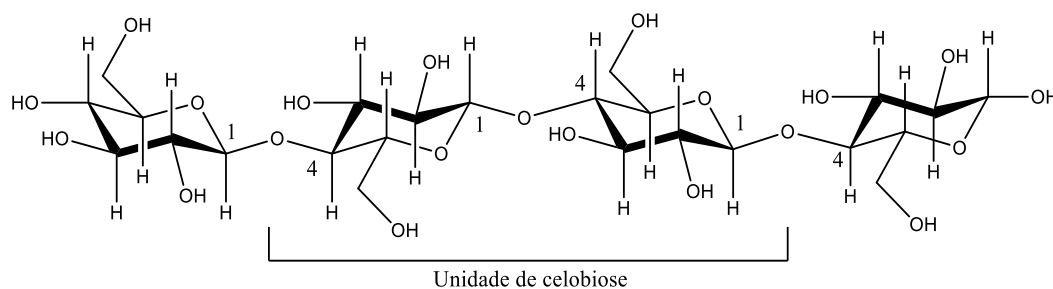


Figura 1.8 – Estrutura química da celulose. Adaptado de [38].

Embora a estrutura da celulose pareça simples, a sua organização supramolecular torna-a num material complexo devido à formação de ligações por pontes de hidrogénio entre grupos hidroxilo da mesma cadeia (ligações intramoleculares) ou de cadeias diferentes (ligações intermoleculares) [8]. As ligações intramoleculares são estabelecidas entre unidades adjacentes na mesma cadeia como é o caso da ligação entre o grupo hidroxilo em C-6 de um resíduo de glucose e em C-2 no resíduo adjacente e entre o oxigénio em C-5 e o grupo hidroxilo em C-3. Por outro lado, as ligações intermoleculares formam-se entre grupos hidroxilo de cadeias adjacentes, como é o caso das ligações por pontes de hidrogénio entre o grupo hidroxilo em C-6 e o grupo em C-3 (Figura 1.9).

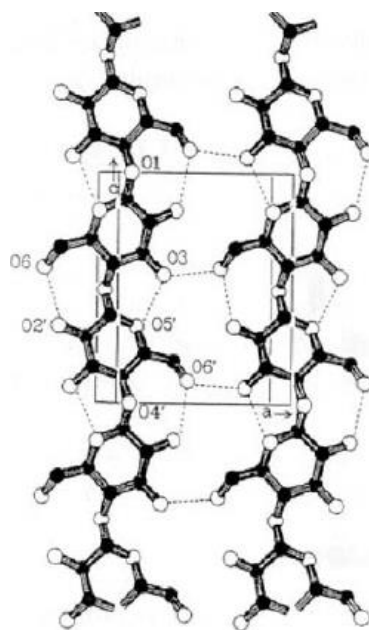


Figura 1.9 – Ligações por pontes de hidrogénio intramoleculares e intermoleculares na estrutura da celulose [38].

Devido à abundância de grupos hidroxilo na estrutura da celulose, esta dá origem a uma estrutura supramolecular em que as ligações por pontes de hidrogénio intramoleculares conferem rigidez a cada cadeia e as ligações intermoleculares são responsáveis pela formação de estruturas primárias organizadas, designadas de fibrilas elementares [8, 22, 35]. Por efeito das ligações por pontes de hidrogénio intermoleculares, as cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas elementares, que por sua vez são constituídas por regiões altamente organizadas (cristalinas) e zonas menos organizadas (amorfas) [8, 22].

Por agregação das fibrilas elementares formam-se microfibrilas, sendo um conjunto destas designado de macrofibrilas, que por sua vez, servem de base para a formação de fibrilas e, conseqüentemente, das fibras de celulose (Figura 1.10). Como consequência da sua estrutura fibrosa e das ligações por pontes de hidrogénio fortes, as fibras de celulose apresentam elevada resistência à tração e são insolúveis na grande maioria dos solventes comuns [8, 34].

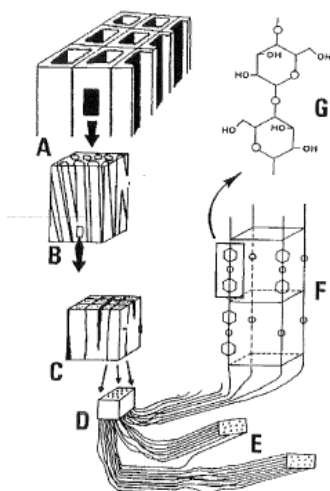


Figura 1.10 - Representação esquemática da organização da celulose nas fibras da madeira: A - corte das fibras da madeira; B - fração da fibra formada por macrofibrilas; C - Macrofibrilas; D - Microfibrilas; E - Fibrila Elementar; F - Célula unitária; G - Unidade de celobiose. Adaptado de [38].

### 1.2.3. Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos e diferem da celulose pois a sua estrutura compreende diferentes monossacarídeos, possuem ramificações na sua cadeia e têm um grau de polimerização mais baixo (entre 70 e 130 para hemiceluloses de resinosas e entre 100 e 200 para as de folhosas) [41].

Os monossacarídeos que constituem a estrutura das hemiceluloses compreendem pentoses (unidade de xilose e arabinose), hexoses (unidade de glucose e manose), ácidos hexurônicos (ácido glucorónico) e desoxihexoses (unidades de ramnose) [8, 37].

A cadeia principal das hemiceluloses pode ser constituída por apenas um tipo de monossacarídeos, como é o caso das xilanas que contêm unidades de xilose, ou por dois ou mais monossacarídeos, como as glucomananas que contam com unidades de manose e glucose. Algumas unidades de açúcares encontram-se principalmente em ramificações da cadeia principal, como é o caso do ácido 4-*O*-metilglucorónico presente nas xilanas [8]. A natureza e a abundância relativa das hemiceluloses difere com a sua origem: nas espécies resinosas as hemiceluloses predominantes são as glucomananas e nas folhosas as xilanas são as principais hemiceluloses [41].

As xilanas são polissacarídeos cuja cadeia principal é constituída por unidades de xilose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . A intervalos irregulares, unidades de ácido 4-*O*-metil-D-glucorónico ligam-se às unidades de xilose por meio de ligações glicosídicas  $\alpha(1 \rightarrow 2)$  [8, 37]. Por fim alguns dos grupos hidroxilo em C-2 e C-3 das unidades de xilose são substituídos por grupos *O*-acetilo, resultando numa estrutura mais rigorosamente designada por *O*-acetil-4-*O*-metilglucoronoxilana, ou ainda glucuronoxilana em vez de xilana (Figura 1.11) [8, 37].

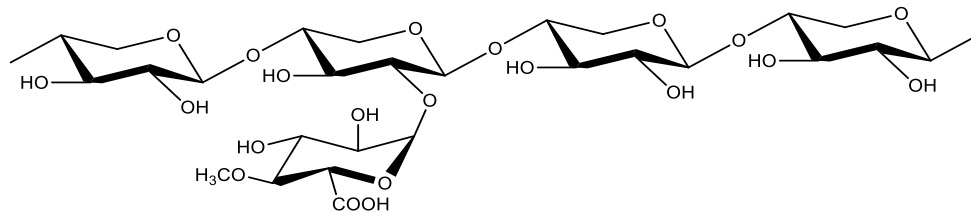


Figura 1.11 – Estrutura química parcial de uma *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana. Adaptado de [8].

Na madeira de *E. globulus* a estrutura da glucuronoxilana é diferente da conhecida para folhosas, sendo constituída por galactose, ácido glucurónico e xilose na proporção 1:3:30. Este polissacarídeo é uma (galacto-4-*O*-metil-*D*-glucurono)-*D*-xilana (Figura 1.12). Nesta estrutura resíduos de  $\beta$ -*D*-xilopiranosose são unidos por ligações  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4) e apresentam ramificações na posição 2-*O* com cadeiras curtas compostas por ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -*D*-glucurónico e por ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -*D*-glucurónico substituído na posição 2-*O* por  $\alpha$ -*D*-galactose [42].

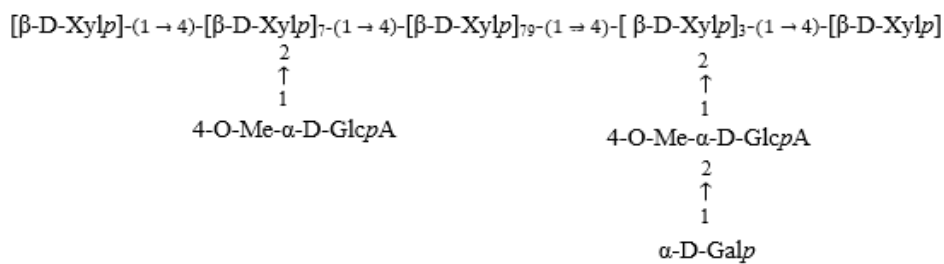


Figura 1.12 – Fórmula abreviada de glucuronoxilana de *Eucalyptus globulus* Labill. Adaptado de [42].

#### 1.2.4. Lenhina

A lenhina é um dos principais componentes macromoleculares da madeira e casca de *E. globulus*, tratando-se de um polímero aromático de estrutura amorfa, altamente reticulado e insolúvel em água [40].

A estrutura da lenhina consiste numa rede tridimensional irregular constituída por unidades de fenilpropano com diferentes padrões de substituição e unidas por vários tipos de ligação, como é ilustrado na Figura 1.13 [8, 38]. A heterogeneidade das ligações entre as unidades de fenilpropano leva a que a lenhina não possa ser descrita com uma fórmula simples como os polissacarídeos.

O tipo de ligações mais frequentes na estrutura da lenhina tanto em madeira de folhosas como de resinosas são as ligações do tipo éter alquil-arálico que ligam mais de dois terços das unidades de fenilpropano, destacando-se a ligação  $\beta$ -*O*-4 cuja abundância em madeira de folhosas é de 60%. As restantes unidades de fenilpropano encontram-se ligadas por ligações carbono-carbono, consideradas

mais resistentes do que as anteriores, como as ligações  $\beta$ - $\beta'$ , com abundância entre 3 e 7% em madeira de folhosas, e as ligações 5-5', com abundância entre 4 e 10% [36, 38].

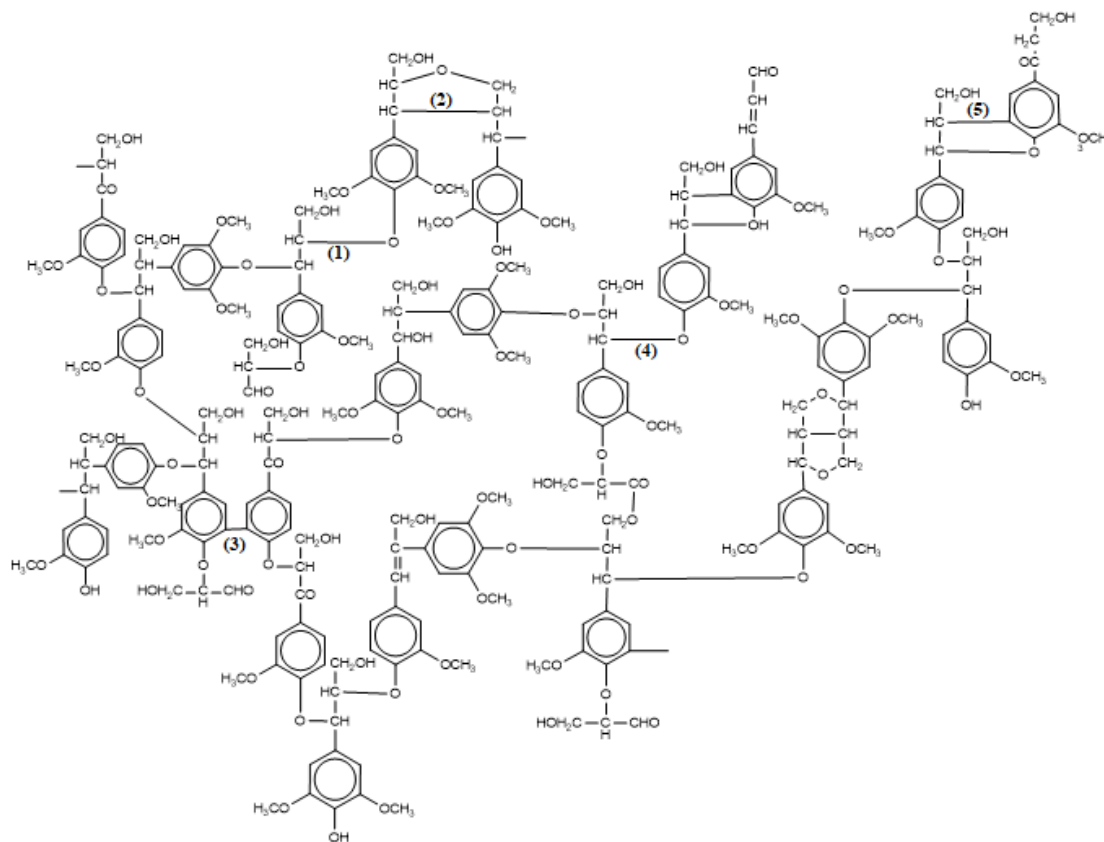


Figura 1.13 – Fração representativa da estrutura da lenhina de faia (*Fagus sylvatica*) e das principais ligações entre unidade de fenilpropano: (1)  $\beta$ -O-4; (2)  $\beta$ - $\beta'$ ; (3) 5-5'; (4)  $\alpha$ -O-4; (5)  $\beta$ -5. Adaptado de [43].

Os precursores biossintéticos da lenhina são os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que diferem apenas no número de grupos metoxila presentes nas posições 3 e 5 (Figura 1.14). A polimerização destes precursores leva à estrutura da lenhina, que é constituída por três tipos de unidades aromáticas, as unidades do tipo seringilo (S), guiacilo (G) e p-hidroxifenilo (H) [8, 36].

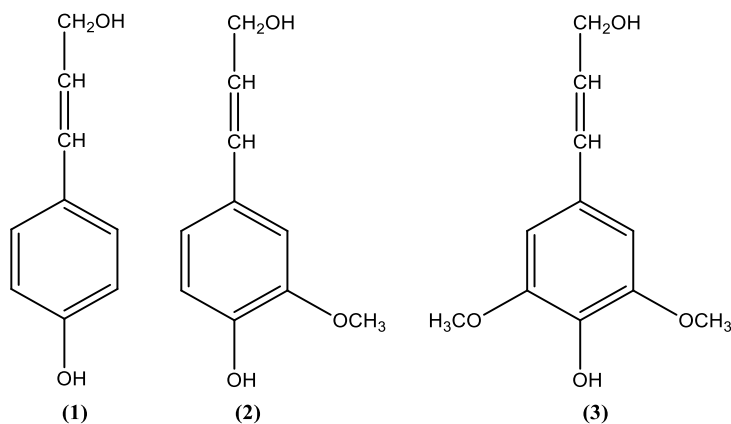


Figura 1.14 – Estruturas químicas dos precursores da lenhina: (1) Álcool cumarílico; (2) Álcool coniferílico; (3) Álcool sinapílico. Adaptado de [8].



A reatividade química da lenhina varia com base na proporção das unidades de precursores presentes na sua estrutura, sendo que para madeira de folhosas e de resinosas a distribuição das mesmas difere. A lenhina presente na madeira de resinosas é comumente designada de lenhina do tipo G pois é formada maioritariamente por unidades derivadas de guaiacilo. No caso da madeira de folhosas, a lenhina é do tipo GS pois é formada maioritariamente por unidades derivadas de guaiacilo e seringilo, sendo que em ambas as madeiras as unidades derivadas de p-hidroxifenilo são as que menos contribuem para a estrutura da lenhina [8, 38].

Na literatura é relatada a caracterização da estrutura da lenhina presente na madeira e na casca de *E. globulus*, verificando-se que não existem diferenças significativas quer no tipo de ligações quer nos grupos funcionais presentes na estrutura da lenhina de ambas. Salienta-se apenas uma diferença nas razões entre as unidades aromáticas constituintes (S:G:H), que na lenhina da madeira é 80:20:0 e na lenhina da casca é de 73:23:4 [44].

No material lenhocelulósico a lenhina e os polissacarídeos encontram-se associados e formam ligações covalentes entre si, o que confere rigidez e firmeza às fibras celulósicas [40]. A associação entre os compostos macromoleculares é evidenciada pela dificuldade de isolamento da celulose, hemiceluloses e lenhina de forma completa por tratamentos químicos seletivos [8, 40]. Esta relação tem vindo a ser alvo de numerosos estudos devido ao interesse na acessibilidade e reatividade dos compostos macromoleculares para produção de pasta. Para esse efeito é necessária a individualização das fibras celulósicas, recorrendo-se a processos físicos e/ou químicos de deslenhificação para remover a lenhina [46].

### 1.3. Produção de soluções de açúcares

O aumento do preço do petróleo e a necessidade de reduzir as emissões de gases de efeito de estufa estão a aumentar a apetência dos consumidores para produtos ecológicos e sustentáveis, viabilizando progressivamente a produção e comercialização de produtos de origem renovável, como substitutos dos produtos de origem petroquímica [2, 4]. A integração de sistemas de biorefinaria é a base de uma economia focada na utilização inovadora e rentável de biomassa para a produção de produtos químicos, materiais e energia de base biológica. Nestes processos podem ser utilizados diversos tipos de biomassa destacando-se a florestal, agrícola, aquático e os resíduos da indústria [20].

A crescente necessidade de matéria-prima, associada às limitações impostas pela UE no uso de culturas que compitam com a alimentação, tornam a biomassa florestal a principal fornecedora de matéria-prima da bioindústria [1, 2, 5]. A emergência deste mercado, com taxas de crescimento significativas tem atraído várias empresas da fileira florestal que procuram capitalizar com a crescente procura de materiais lenhocelulósicos, uma vez que os seus componentes principais

(celulose, hemiceluloses e lenhina) são a matéria-prima de base para produção de produtos químicos e materiais de valor acrescentado [20, 47, 48]. Através do fracionamento da biomassa florestal, convencionalmente utilizada para a produção de pasta de papel, produzem-se frações ricas em polissacarídeos que têm diversas finalidades, nomeadamente a produção de açúcares simples [20, 48]. Por sua vez, as soluções de açúcares simples são alvo de processos de conversão bioquímica, como fermentação, ou conversão química, como é o caso da hidrólise ácida, formando compostos (*building blocks*) que podem ser convertidos num amplo número de derivados [48]. De entre as aplicações das soluções de açúcares destaca-se a sua fermentação para produção de bioetanol que, devido à crescente procura de biocombustíveis, tem vindo a ser alvo de estudo e interesse [2].

Algumas empresas internacionais têm-se focado no estudo da conversão de aparas de madeira em soluções de açúcares simples, deixando de parte os restantes subprodutos florestais, como casca, serrim, ramos e topos, cuja abundância e composição química, que tem por base a mesma matriz lenhocelulósica que a madeira, permitem a sua integração na bioindústria [11].

Para a produção de açúcares simples a cadeia dos polissacarídeos presentes nos materiais lenhocelulósicos é despolimerizada por clivagem das ligações entre as unidades monoméricas, método denominado de sacarificação. Atualmente os principais métodos de sacarificação de biomassa são a hidrólise enzimática e a hidrólise com ácido diluído [50]. A despolimerização da cadeia dos polissacarídeos catalisada por enzimas resulta apenas em reações de hidrólise, enquanto que utilizando ácido diluído as reações de hidrólise são acompanhadas por reações de degradação por desidratação de xilose e glucose, uma vez que estes açúcares na presença de ácidos formam furfural e hidroximetilfurfural, respetivamente [18, 50].

### **1.3.1. Pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos**

A conversão completa e eficiente dos materiais lenhocelulósicos em açúcares simples através de hidrólise enzimática tem sido vastamente estudada, reportando-se que a interação entre os seus principais componentes (celulose, hemiceluloses e lenhina) confere uma estrutura resistente à biodegradação dos materiais [51]. A celulose condiciona a ação das enzimas com a sua estrutura cristalina, grau polimerização e limitada área superficial acessível às enzimas [52]. Por sua vez, as hemiceluloses revestem as microfibrilas de celulose formando uma barreira física ao acesso das enzimas à superfície da celulose, tendo sido reportado que a remoção de hemiceluloses aumenta a eficiência da hidrólise enzimática da celulose [48, 49]. Relativamente à lenhina, esta forma uma barreira física que dificulta a ação das enzimas descrevendo-se na literatura que a sua remoção, por processos de deslenhificação, ou modificação da sua estrutura permite o aumento da acessibilidade das enzimas à celulose [23, 48, 50].

Para ultrapassar os impedimentos impostos pelos componentes dos materiais lenhocelulósicos à hidrólise enzimática, os materiais são sujeitos a pré-tratamentos para remover as barreiras físicas da parede celular e da estrutura cristalina da celulose tornando-a mais acessível às enzimas para a sua conversão em glucose [2, 5, 48]. Os processos de pré-tratamento podem ser classificados como biológicos, físicos, químicos e físico-químicos. A escolha do pré-tratamento correto está dependente do tipo de matéria-prima utilizada, bem como do impacto económico e ambiental do processo [5].

#### **1.3.1.1. Pré-tratamento físico**

Os processos de pré-tratamento físico têm por base a redução do tamanho da biomassa em partículas mais pequenas, tornando-a a biomassa mais acessível às enzimas hidrolíticas [5, 51]. Os processos de pré-tratamento físico não removem lenhina da matriz lenhocelulósica, sendo este um passo necessário para melhorar a digestibilidade do material, e apresentam requisitos energéticos elevados que os tornam economicamente inviáveis à escala comercial [51].

#### **1.3.1.2. Pré-tratamento físico-químico**

Os processos de pré-tratamento físico-químicos têm vindo a ser amplamente estudados destacando-se o tratamento com água líquida sobreaquecida e o processo de explosão a vapor [5].

##### **a) Pré-tratamento com água líquida sobreaquecida**

O pré-tratamento com água sobreaquecida é um processo hidrotérmico e uma das estratégias de pré-tratamento mais promissoras. O principal objetivo deste processo é solubilizar parte das hemiceluloses e extratáveis mais polares e tornar a celulose mais acessível às enzimas hidrolíticas [5]. Para isso, neste processo utilizam-se pressões elevadas para manter a água no estado líquido a temperaturas elevadas, entre 160 e 240°C, provocando alterações na estrutura da matriz lenhocelulósica [52–54]. Nestas condições de operação a ionização da água leva à desacetilação das hemiceluloses e formação de ácido acético que auto-catalisa a hidrólise das hemiceluloses e, conseqüentemente, a solubilização das mesmas, resultando no aumento da acessibilidade da celulose [50, 53].

As hemiceluloses solubilizadas na fração aquosa encontram-se predominantemente na forma de oligossacarídeos permitindo a recuperação das pentoses que os constituem e a sua reintegração na biorefinaria [57]. Por último, durante o tratamento com água sobreaquecida parte da lenhina é despolimerizada e solubilizada, embora a sua remoção não seja completa [2, 59].

**b) Pré-tratamento por explosão a vapor**

No pré-tratamento por explosão a vapor o material lenhocelulósico é colocado num sistema que contém água quente (a temperaturas entre 160 e 260°C) a pressão elevada (entre 0,69 e 4,83 MPa), sendo sujeito a descompressão súbita para pressão atmosférica [5]. O vapor de água penetra no material lenhocelulósico e condensa, formando água líquida dentro das fibras. Posteriormente, com a descompressão do sistema a água presente nas fibras é rapidamente evaporada, originando uma explosão interna nas mesmas. Dependendo do tempo de residência e da temperatura usada a desagregação do material fibroso em fibras e aglomerados de fibras pode ser mais ou menos intensa [58]. À semelhança do que acontece no pré-tratamento com água sobreaquecida, na explosão a vapor também há libertação de ácido acético que resulta na hidrólise parcial dos compostos da matriz lenhocelulósica [5, 54]. Neste processo ocorre a solubilização das hemiceluloses e a alteração da estrutura da lenhina [5]. Tipicamente o pré-tratamento da biomassa por explosão a vapor resulta numa maior degradação dos hidratos de carbono e conseqüente diminuição da recuperação de pentoses, quando comparado com o tratamento com água líquida sobreaquecida [57].

**1.3.1.3. Pré-tratamento químico**

Os processos de pré-tratamento químico são a categoria de tratamentos de biomassa mais estudada e são utilizados extensivamente pela indústria de pasta de papel para a deslenhificação de material lenhocelulósico. O pré-tratamento químico tem como principal objetivo a remoção de lenhina e/ou hemiceluloses para potenciar a biodegradação da celulose, influenciando, ainda que de forma menos significativa, o grau de polimerização e a estrutura cristalina da celulose [5]. As tecnologias de pré-tratamento químico mais comuns são o pré-tratamento ácido, alcalino, organossolve e o cozimento kraft [1, 2, 56].

**a) Pré-tratamento ácido**

O pré-tratamento ácido tem como principal efeito a remoção de hemiceluloses, aumentando a digestibilidade da celulose face a hidrólise enzimática [2]. Este tratamento pode ser realizado sob temperaturas elevadas e concentrações baixas de ácido (pré-tratamento com ácido diluído) ou sob temperaturas baixas e concentrações altas de ácido (pré-tratamento com ácido concentrado), constatando-se que para o pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos, a utilização de ácido diluído se encontra mais desenvolvida permitindo evitar problemas de corrosão dos equipamentos e gastos energéticos elevados para a recuperação do solvente [2].

O processo de pré-tratamento com ácido diluído pode ser aplicado como pré-tratamento de matérias lenhocelulósicas antes da hidrólise enzimática dos mesmos, e na hidrólise ácida da biomassa

para obter açúcares fermentáveis [5, 56]. Desta forma, o pré-tratamento com ácido diluído em condições de operação menos severas permite solubilizar e recuperar grande parte das hemiceluloses evitando a degradação da celulose por hidrólise ácida e, simultaneamente, tornando-a mais acessível às enzimas [1, 2, 5, 56].

#### **b) Pré-tratamento organossolve**

O processo organossolve tem como principal objetivo a deslenhificação da matriz lenhocelulósica utilizando solventes orgânicos ou misturas aquosas dos mesmos a temperaturas entre 100 e 250°C, recorrendo ou não à adição de um ácido como catalisador [1, 49]. Os solventes mais utilizados são o metanol e o etanol, pois são economicamente mais viáveis e fáceis de recuperar [53].

A lenhina presente no material lenhocelulósico é hidrolisada, sob as condições do processo, em fragmentos de baixo peso molecular que se solubilizam na fase aquosa [1, 5]. Durante este pré-tratamento, ocorre também a desacetilação das hemiceluloses, formando ácido acético que autocatalisa a hidrólise ácida das mesmas, dando origem a oligossacarídeos e monossacarídeos. Na literatura é indicado que embora a adição de catalisadores ácidos ao processo não seja necessária uma vez que há formação de ácido acético durante o mesmo, quando estes são adicionados o grau de deslenhificação atingido é superior [53].

O processo organossolve é também designado na literatura como um processo de desconstrução de biomassa, pois dá origem a um material fibroso com menor teor de lenhina do que o inicial.

#### **c) Pré-tratamento por cozimento kraft**

Os processos de produção de pasta, a partir de madeira ou outros materiais lenhocelulósicos, incluem uma etapa designada por cozimento, na qual a matéria-prima é tratada mecânica e/ou quimicamente com o intuito de separar as fibras celulósicas para produção de pasta [46].

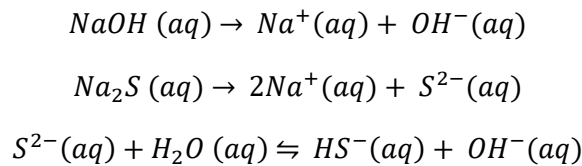
Existem diferentes processos de cozimento (químico, semi-químico, químico-mecânico e mecânico) que se diferenciam pelas condições aplicadas para a separação das fibras. O processo de cozimento químico tem por base a despolimerização e dissolução de lenhina num licor de cozimento a temperatura e pressão elevadas, enquanto que o cozimento mecânico usa apenas energia mecânica para o tratamento da matéria-prima. Embora o processo químico apresente menor rendimento do que o processo mecânico, é o mais utilizado a nível industrial uma vez que neste processo as fibras celulósicas sofrem menos degradação mecânica obtendo-se pastas com maior resistência físico-mecânica [8, 34, 37]. O primeiro processo de cozimento químico em meio alcalino foi o processo “à soda” que utiliza hidróxido de sódio como reagente de cozimento. Mais tarde a introdução de sulfuretos na produção de pasta levou ao desenvolvimento do processo “ao sulfato”, que utiliza além

de hidróxido de sódio, o sulfureto de sódio como reagente ativo [37, 38]. Este processo, comumente designado de “processo kraft”, é aplicável a quase todas as espécies de madeira e permite obter pastas com maior resistência físico-mecânica [40]. Devido à diversidade de madeira que se pode utilizar neste processo, tem-se verificado o aumento do interesse em também utilizar casca, ramos, serrim e outros tipos de biomassa florestal de árvores folhosas como fontes de fibra alternativa [13].

O cozimento kraft tem vindo a ser explorado como processo de pré-tratamento ou de desconstrução de biomassa lenhocelulósica com um intuito de fracionar os seus constituintes para obter fibras celulósicas suscetíveis de serem usadas na produção de açúcares simples [7]. Esta tecnologia já se encontra implementada à escala industrial para produção de pasta de papel a partir de aparas de madeira, o que torna apelativa a sua utilização num contexto de biorefinaria [47].

**i. Breve descrição do processo de cozimento kraft**

O cozimento kraft é realizado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na<sub>2</sub>S) denominada de licor branco ou licor de cozimento. Os agentes ativos no cozimento kraft são os iões hidróxido (OH<sup>-</sup>) e hidrogenossulfureto (HS<sup>-</sup>), obtidos a partir das reações químicas seguintes [40]:



Tecnicamente, a concentração dos agentes ativos é expressa de acordo com a terminologia indicada na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 – Terminologia associado ao cozimento kraft. Adaptado de [40].

<b>Termo</b>	<b>Definição</b>	<b>Unidades</b>
<i>Alcali</i> Ativo (AA)	$[NaOH + Na_2S]$	$g_{Na_2O}/L$
<i>Alcali</i> Efetivo (AE)	$[NaOH + \frac{1}{2} Na_2S]$	$g_{Na_2O}/L$
Sulfidez (S)	$\frac{[Na_2S]}{[NaOH + Na_2S]} \times 100$	$\%_{Na_2O}$
Hidromódulo (HM)	$V_{licor}/m_{matéria\ prima}$	$L/kg$
Carga alcalina	$\frac{AA}{m_{matéria\ prima}}$	$\%$

Os parâmetros indicados acima são definidos com base no tipo de matéria-prima utilizada no cozimento e nas propriedades pretendidas para a pasta, desde o índice kappa (IK), parâmetro de

medida do grau de deslenhificação da pasta, ao rendimento depurado em pasta, que revela a perda de polissacarídeos e a produtividade da biomassa sob as condições do cozimento.

O hidromódulo (HM) é geralmente estabelecido com base nas dimensões do digestor e na densidade da matéria-prima utilizada, sabendo-se que materiais lenhocelulósicos com densidade baixa, como a casca de *E. globulus* requerem hidromódulo maior, de forma a garantir a impregnação eficiente com licor [12]. A carga alcalina também influencia o rendimento e a qualidade da pasta uma vez que o seu aumento leva à intensificação da deslenhificação e da degradação parcial dos polissacarídeos presentes, devido à baixa seletividade do processo para a deslenhificação [8].

O índice kappa (IK) é um parâmetro amplamente utilizado para estimar a quantidade de lenhina residual nas pastas e permite efetuar estudos comparativos do grau de deslenhificação atingido em diferentes cozimentos, com base na redução do IK. Este parâmetro é obtido por titulação de pasta kraft, sob condições específicas, com uma solução de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) e mede a quantidade total de material oxidável presente na pasta. Na literatura existente descreve-se que a lenhina residual e os ácidos hexenurônicos são os grupos que mais contribuem para o IK [61, 62]. No entanto, este método não distingue a lenhina residual presente na pasta de outros grupos suscetíveis a oxidação, como ácidos hexenurônicos, formados a partir do ácido 4-*O*-metil-D-glucorônico presente na cadeia das xilanas durante o cozimento kraft [62].

O estudo do cozimento kraft como um método de pré-tratamento da casca de *E. globulus* foi realizado em estudos recentes através da análise do impacto das condições do processo (alcalinidade, duração e temperatura) no rendimento depurado e no IK obtidos [11, 12]. Através de cozimentos com diferentes fatores H, que combinam durações em patamar de 60 e 80 minutos com temperaturas de 160°C e 170°C, e carga alcalina entre 20% e 28% verificou-se que: para o mesmo fator H, o aumento da alcalinidade do cozimento beneficia a deslenhificação eficaz do material; cozimentos com fator H mais baixo apresentam rendimentos depurados baixos pois a quantidade de incozidos resultante, que não é contabilizada no rendimento depurado, é maior; cozimentos com fator H maior resultam no aumento da extensão da deslenhificação traduzido pela diminuição do IK [12]. No cozimento kraft da casca, com duração de 60 minutos a 170°C, observou-se que o aumento da alcalinidade de 26% para 27% levou a um grande decréscimo do IK, de 18,4 para 10,0, sem afetar significativamente o rendimento depurado, cujo valor se manteve entre 43,9% e 43,8%, denotando a seletividade do processo de cozimento kraft para a casca [12]. Este estudo demonstrou a aptidão da casca para o cozimento kraft, pela preservação dos polissacarídeos com o aumento da deslenhificação [12].

Na literatura é também detalhado o estudo da casca de *E. globulus* enquanto fonte alternativa de fibra celulósica, por cozimento kraft, bem como o estudo da incorporação de casca no cozimento de

madeira de *E. globulus* [13]. Comparativamente ao cozimento da madeira de *E. globulus*, no qual se obteve um rendimento depurado de 58,9% e IK de 18,4, o cozimento da casca nas mesmas condições processuais apresenta rendimento inferior, 47,2%, e IK superior, 36,1 [10]. Assim sendo, verificou-se que a casca requer condições de cozimento mais severas para atingir o mesmo grau de deslenhificação que o cozimento da madeira. Esta necessidade pode estar associada à elevada quantidade de extratáveis polares presentes na casca, uma vez que esta é uma das principais diferenças entre a composição química da casca e da madeira [10, 12].

## ii. Reações da lenhina no processo de cozimento kraft

O fundamento da produção de pasta kraft é a separação das fibras celulósicas por despolimerização e solubilização química da lenhina presente na matéria-prima, afetando o mínimo possível os polissacarídeos [24]. No cozimento kraft a clivagem das ligações entre as unidades de fenilpropano resultam na redução do grau de reticulação e da massa molecular da lenhina, bem como na libertação de grupos hidroxilo, que levam à dissolução progressiva da lenhina no licor de cozimento.

Em meio alcalino o comportamento e estabilidade das ligações diferem entre si. As ligações éter alquil-arílico entre as unidades de fenilpropano são clivadas e, com extensão significativa, também as ligações carbono-carbono do tipo aril-alquilo [24]. As ligações do tipo éter di-arílico e do tipo carbono-carbono são estáveis nas condições do cozimento [24]. As ligações  $\alpha$ - e  $\beta$ -arílico são predominantes na estrutura da lenhina e por isso a sua clivagem é o principal responsável pela despolimerização da lenhina [23, 38].

A despolimerização e dissolução da lenhina no licor divide-se em três fases: fase inicial, fase principal e fase residual. A fase inicial ocorre a temperaturas inferiores a 140°C, sendo a velocidade de deslenhificação baixa e o processo controlado pela difusão dos agentes ativos na matéria-prima. Nesta fase apenas 20 a 30% da lenhina é removida e ocorre a degradação de polissacarídeos através da reação de *peeling*, que corresponde à clivagem de ligações glicosídicas em resíduos terminais [24, 34, 38]. Com o aumento gradual da temperatura durante o cozimento atingem-se temperaturas superiores a 140°C e a deslenhificação atinge a sua fase principal. Nesta fase, a percentagem de deslenhificação é mais elevada, resultando na remoção de cerca de 90% da lenhina, e a seletividade para a deslenhificação é máxima, ou seja, a degradação de polissacarídeos é relativamente pequena [24, 34, 38].

A fase final do cozimento a partir da qual não há remoção significativa de lenhina sem afetar a qualidade das fibras, designa-se de fase residual. Esta fase é caracterizada por baixa seletividade e velocidade de deslenhificação, ou seja, a velocidade de dissolução de polissacarídeos torna-se



significativa, podendo ultrapassar a da lenhina. Por estes motivos, o cozimento deve ser interrompido nesta fase para evitar que o rendimento e as propriedades da pasta sejam afetadas [24, 34, 38, 42].

As reações da lenhina e dos polissacarídeos que ocorrem durante o cozimento kraft, encontram-se sumariadas na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Principais reações da lenhina e dos polissacarídeos durante o cozimento kraft. Adaptado de [38, 64].

Fase do cozimento	Reações da lenhina	Reações dos polissacarídeos
Inicial	Clivagem das ligações $\alpha$ -O-4 em unidades fenólicas; Clivagem das ligações $\beta$ -O-4 em unidades fenólicas; Reações de condensação;	Remoção sequencial de unidades de açúcar do extremo redutor da cadeia de polissacarídeo ( <i>peeling</i> );  Estabilização do polissacarídeo (reações de bloqueio - <i>stopping</i> );
Principal	Clivagem das ligações $\beta$ -O-4 em unidades não fenólicas; Clivagem das ligações $\alpha$ -O-4 em unidades fenólicas; Clivagem das ligações $\beta$ -O-4 em unidades fenólicas; Reações de condensação; Clivagem de ligações carbono-carbono;	Hidrólise alcalina de ligações glicosídicas, seguida de remoção sequencial de unidades de açúcar do extremo redutor da cadeia de polissacarídeo ( <i>peeling</i> secundário);  Estabilização do polissacarídeo ( <i>stopping</i> );
Residual	Clivagem de ligações carbono-carbono; Reações de condensação;	Clivagem de ligações carbono-carbono;

A clivagem da ligação  $\alpha$ -O-4 requer a ionização do seu grupo fenólico em meio alcalino e resulta na formação do intermediário derivado quinona (**I**), que é a base das restantes reações de degradação da lenhina. O mecanismo desta reação encontra-se na Figura A. 1 do Apêndice A. As ligações  $\beta$ -O-4 entre unidades fenólicas são rapidamente clivadas por adição nucleofílica de iões hidrogenossulfureto (HS<sup>-</sup>) ao intermediário derivado quinona previamente formado, como se observa no mecanismo da Figura A. 2 do Apêndice A. Por outro lado, a clivagem de ligações  $\beta$ -O-4 entre unidades não-fenólicas é mais lenta, sendo que a velocidade desta reação depende da concentração

de íons hidróxido (OH<sup>-</sup>) no meio [8, 23]. O mecanismo da reação encontra-se na Figura A. 3 do Apêndice A.

A clivagem de ligações carbono-carbono ocorre na cadeia lateral, entre cadeias laterais e entre a cadeia lateral e o anel aromático de unidades de fenilpropano, resultando na formação de estruturas com grupos carbonilo [24]. Uma pequena fração da lenhina é degradada pela clivagem de ligações carbono-carbono da cadeia lateral do derivado quinônico, que leva à eliminação total ou parcial das cadeias laterais (Figura A. 4). Por fim ocorrem as reações de condensação que consistem na formação de ligações carbono-carbono estáveis entre duas ou mais unidades de fenilpropano, o que resulta no aumento do peso molecular da lenhina, podendo levar à precipitação desta sobre as fibras celulósicas (Figura A. 5) [64].

### iii. Reações dos polissacarídeos no processo de cozimento kraft

O processo de cozimento kraft resulta numa perda considerável de hidratos de carbono presentes na matéria-prima, isto é, celulose e hemiceluloses. As principais reações dos polissacarídeos em meio alcalino são a clivagem das ligações glicosídicas em resíduos terminais (reações de *peeling*), as reações de estabilização (reações de *stopping*) e a hidrólise de grupos acetilo das xilanas [40]. A degradação de polissacarídeos durante o cozimento kraft depende da sua acessibilidade e da cristalinidade das fibras, bem como das condições do meio reacional como o pH, a temperatura e a concentração dos reagentes de cozimento [40].

A reação predominante responsável pela degradação e dissolução dos polissacarídeos é a reação de *peeling* que leva ao encurtamento da cadeia principal por eliminação sucessiva do monómero redutor [24, 34]. Esta reação causa perda de rendimento e ocorre na fase inicial do cozimento e, em conjunto com a hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses, que são eliminados como ácido acético, é responsável pelo consumo de reagentes alcalinos [23, 24, 34].

A perda de material na fase inicial do cozimento termina quando ocorre a reação de estabilização dos polissacarídeos através das designadas reações de *stopping*, que impedem posterior remoção e a perda do polissacarídeo completo. A paragem da remoção de resíduos terminais deve-se ao rearranjo do grupo terminal e/ou à inacessibilidade física do reagente à cadeia do polissacarídeo [40]. Os mecanismos das reações de *peeling* e de *stopping* encontram-se ilustrados na Figura A. 6 do Apêndice A.

Os polissacarídeos mantêm-se estáveis até o processo atingir a fase de temperatura mais elevada do cozimento, e nesta ocorre a clivagem aleatória, por hidrólise alcalina, de ligações glicosídicas não-terminais dos polissacarídeos, resultando na redução do grau de polimerização dos mesmos e na formação de novos terminais redutores, que sofrem remoção sequencial (reações de *peeling* secundário) [8, 34].

As hemiceluloses das folhosas, essencialmente xilanas, são mais resistentes às reações de *peeling* do que as hemiceluloses das resinosas, permanecendo na pasta ainda que com perdas substâncias do grau de polimerização [27]. Na literatura é reportado que a estabilidade das xilanas deve-se à presença de resíduos de ácido 4-*O*-metilglucorónico na unidade terminal, que durante o cozimento são convertidos em ácidos hexenurónicos removidos ao longo do processo [60].

### 1.3.2. Pré-extração de compostos fenólicos

Na literatura é indicado que a incorporação de casca de *E. globulus* no processo kraft resulta em menor rendimento e grau de deslenhificação em comparação com o cozimento de madeira [11–13]. Relativamente à hidrólise enzimática da biomassa florestal sujeita a pré-tratamento por cozimento kraft, estudos anteriores mostram que, para a madeira de *E. globulus*, a conversão de polissacarídeos em açúcares simples é de 91% enquanto no caso da casca a conversão é de apenas 3%, indicando que praticamente não ocorre hidrólise dos polissacarídeos presentes na casca [11].

A casca de *E. globulus* possui na sua composição química uma quantidade elevada de extratáveis polares, em especial compostos fenólicos, comparativamente à madeira da mesma espécie [10, 12, 13, 20]. A presença destes compostos na casca poderá ser responsável pela diminuição do grau de deslenhificação e do rendimento depurado no cozimento kraft, bem como pela inibição da sacarificação condicionando a conversão dos polissacarídeos em açúcares simples [11].

Em estudos anteriores foi abordada a extração de compostos fenólicos presentes na casca de *E. globulus* como um processo que antecede a desconstrução por cozimento kraft da mesma. Esta abordagem permite não só beneficiar a desconstrução da casca, minimizando a perda de polissacarídeos suscetíveis a sacarificação, mas também promover a extração de compostos fenólicos com valor acrescentado e propriedades anti-oxidantes [12].

As características do extrato e a seletividade da extração de extratáveis polares, em especial compostos fenólicos, é influenciada pelo meio de extração, pela temperatura de patamar e pela duração da extração [14, 21].

Na literatura é descrita a otimização destas condições, estabelecendo que uma extração a 82,5°C durante 264 minutos com uma mistura etanol/água (52%/48%) maximiza o teor de compostos fenólicos totais no extrato, resultando num rendimento de extração de 5,2% ( $m/m_{\text{casca}}$ ) em que a fração de fenólicos totais no extrato é de 32,3% ( $m_{\text{GAE}}/m_{\text{extrato}}$ ) [21]. Encontra-se ainda descrito que o cozimento kraft da casca previamente extraída com etanol/água, em comparação com o cozimento de casca tal e qual sob as mesmas condições (duração de 60 minutos a uma temperatura de patamar de 170°C, com carga alcalina de 24% e 26%), resultou na diminuição do IK, de valores entre 20,3 e 18,4 para 16,7 e 16,4, e aumento do rendimento depurado em pasta de 45,0% e 43,0% para 46,2%,

contribuindo para o ponto de vista de que os extratáveis prejudicam a deslenhificação através do consumo dos reagentes necessários para a remoção da lenhina [12].

A extração de compostos fenólicos pode também ser realizada utilizando água como meio de extração, reportando-se na literatura que a extração a 140°C durante 60 minutos maximiza a sua remoção e corresponde a um rendimento de extração de 8,85% ( $m/m_{\text{casca}}$ ) em que a fração de fenólicos totais no extrato é de 21,65% ( $m_{\text{GAE}}/m_{\text{extrato}}$ ) [15]. Através do estudo desta extração para diferentes fatores H, verificou-se que o limite máximo de extração de compostos fenólicos não é concordante com a evolução do rendimento de extração, considerando-se que o prolongamento do tempo de extração e/ou o aumento da temperatura provocam a dissolução de compostos presentes na casca que não são fenólicos, mas contribuem para o aumento do rendimento [15].

O processo de pré-extração da casca de *E. globulus* com a mistura etanol/água e com água permite estabelecer uma visão integrada do processo global de produção de açúcares simples a partir de casca. Desta forma, torna-se possível fechar um ciclo de valorização e aproveitamento da casca tirando partido do processo de pré-extração não só para a produção de compostos fenólicos, mas também para a desconstrução da casca e consequente produção de açúcares simples por sacarificação [11, 12, 15].

#### 1.4. Tratamento enzimático de materiais lenhocelulósicos

Após o pré-tratamento do material lenhocelulósico, a celulose e as hemiceluloses encontram-se mais acessíveis às enzimas, facilitando a sua despolimerização com formação de açúcares fermentáveis [47]. Para a hidrólise enzimática das fibras de celulose presentes na pasta é necessária a ação de enzimas pertencentes à classe das hidrolases, especialmente celulasas [65].

O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose (Figura 1.15) requer a ação combinada das endoglucanases, com as celobiohidrolases e as  $\beta$ -glucosidades, sendo que o sinergismo deste sistema de celulasas resulta em atividades enzimáticas mais elevadas do que a ação isolada das enzimas [66]:

- As endoglucanases clivam de forma aleatória as ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$  dentro da cadeia de celulose. Embora a sua ação resulte numa redução rápida do grau de polimerização, acaba por libertar lentamente os açúcares da zona cristalina produzindo glucose e oligossacarídeos de tamanho variável;
- As exoglucanases dividem-se em celobiohidrolases e glucanohidrolases. As glucanohidrolases são as menos usadas, embora consigam libertar a glucose diretamente da cadeia polimérica. As celobiohidrolases podem dividir-se em dois tipos, as que removem a celobiose no sentido do terminal não-redutor para o terminal redutor

(celobiohidrolases I), e as que removem a celobiose no sentido oposto (celobiohidrolases II);

- As  $\beta$ -glucosidases são as últimas a atuar, hidrolisando a celobiose em unidades de glucose.

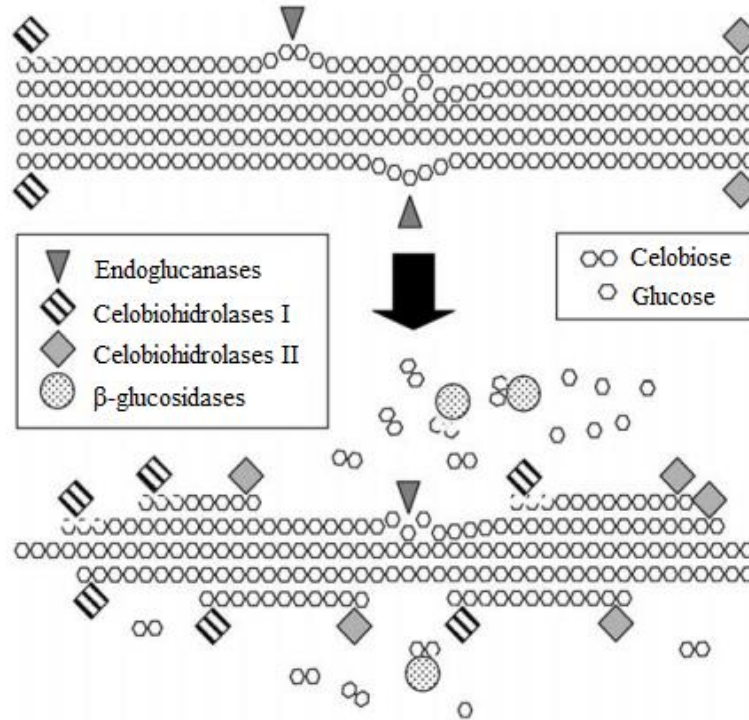


Figura 1.15 – Mecanismo do processo de hidrólise enzimática da celulose. Adaptado de [67].

A atividade enzimática de um sistema de celulases depende de um conjunto de fatores, destacando-se a natureza do substrato e do solvente, bem como o pH e a temperatura do meio. Estes últimos requerem especial atenção uma vez que a sua variação para lá do intervalo ótimo de atuação de cada enzima pode resultar na desnaturação da mesma [68]. No caso do sistema de celulases descrito acima as condições de atuação do sistema encontram-se no intervalo de pH entre 4,5 e 5,0 e no intervalo de temperatura entre 45°C e 50°C.

Na literatura são reportados ensaios de hidrólise enzimática de diferentes subprodutos florestais de *E. globulus*, como galhos, finos e casca, previamente processados por cozimento kraft, bem como de pastas industriais para referência [11]. Ao longo dos ensaios, realizados sob as mesmas condições de atuação, a libertação de açúcares foi monitorizada determinando-se a eficiência de cada ensaio em termos de concentração de açúcares e conversão dos polissacarídeos em glucose e xilose.

Os materiais lenhocelulósicos sujeitos a cozimento kraft, à exceção da casca de *E. globulus*, demonstraram uma elevada digestibilidade por hidrólise enzimática, em especial as pastas obtidas laboratorialmente a partir de finos e galhos que apresentaram rendimentos em conversão de 95% e 85%, respetivamente. O comportamento destes materiais aproxima-se do registado para a pasta

industrial de madeira de *E. globulus*, cuja conversão em glucose e xilose atingiu valores entre 91% e 95%, respetivamente [11]. Estudos anteriores indicam que a conversão de polissacarídeos em açúcares simples na hidrólise enzimática de pasta industrial de madeira de *E. globulus* é superior, quando é utilizado um volume de mistura comercial de enzimas Cellic Ctec 2 correspondente a uma carga enzimática de 25 FPU/g<sub>HC</sub> [69, 72].

O processamento da casca por cozimento kraft a uma temperatura de patamar de 170°C durante 60 minutos com alcalinidade de 26%, resultou em pasta com IK 18,4 e a hidrólise enzimática da fração sólida resultante apresentou conversão em açúcares redutores de 3,1%, indicando que não ocorreu praticamente hidrólise de polissacarídeos. Perante estes resultados foram estudadas possíveis etapas de pré-processamento da casca, de forma a esclarecer quais as condicionantes da hidrólise enzimática da casca, como: a pré-extração de compostos fenólicos com etanol/água; o aumento da carga enzimática da hidrólise; a melhoria da lavagem da pasta e aumento da carga alcalina do cozimento; e a redução do teor de sólidos iniciais na hidrólise e controlo do pH [11].

Tal como foi mencionado anteriormente a pré-extração de compostos fenólicos presentes na casca influencia o cozimento kraft da mesma, permitindo produzir pastas com menor teor de lenhina residual sem afetar significativamente o rendimento depurado. Os resultados obtidos em estudos anteriores mostram que a pré-extração seguida de cozimento kraft, nas mesmas condições utilizadas para a casca tal e qual, resulta em pasta com IK 16,4 cuja hidrólise enzimática não é completa, registando-se uma conversão de polissacarídeos em açúcares simples de 59,1% [11].

No pré-processamento por aumento da carga enzimática da hidrólise, para a mesma concentração de substrato, pasta de casca, encontra-se disponível uma maior concentração de enzima. Este estudo indica que a velocidade da hidrólise aumenta com o aumento da carga enzimática resultando numa maior conversão de polissacarídeos em açúcares simples ao longo do tempo. No entanto, para este pré-processamento a hidrólise não é completa registando-se uma conversão em açúcares de 67,8% [11].

Na literatura são também reportados estudos que indicam que o aumento da carga alcalina do cozimento kraft da casca permite obter pastas com IK semelhante ao das pastas de madeira de *E. globulus*. Ainda assim a hidrólise enzimática da pasta de casca apresenta uma conversão em açúcares simples baixa, 30,9 %, que pode ser causada pela formação de compostos inibidores da hidrólise devido ao uso de cargas alcalinas elevadas [11].

Por último a redução do teor de sólidos iniciais na hidrólise e o controlo rigoroso do pH ao longo do ensaio, permitiram atingir uma conversão em açúcares simples significativa, 76,1%.

De entre os pré-processamentos estudados, a redução do teor de sólidos iniciais na hidrólise atinge a maior conversão de polissacarídeos em açúcares simples. Contudo, a diminuição do teor de

sólidos corresponde a uma menor concentração de polissacarídeos iniciais na hidrólise, o que afeta de forma indesejável a concentração da solução de açúcares simples obtida.

Verifica-se assim que este pré-processamento permite melhorar a hidrólise enzimática da casca, mas a redução do teor de sólidos iniciais reduz de forma indesejável a concentração da solução de açúcares final [11].

## 1.5. Objetivos do trabalho

A casca de *Eucalyptus globulus* é um subproduto comum na indústria da pasta de papel e, dada a sua abundância e composição química, tem vindo a ser estudada a sua utilização no contexto de biorefinaria, nomeadamente para a produção de soluções de açúcares simples. A casca de *E. globulus* difere da madeira da mesma espécie, essencialmente no seu elevado teor de extratáveis polares, nomeadamente compostos fenólicos. Contudo, em comparação com a madeira, o cozimento kraft da casca requer condições mais severas para atingir o mesmo grau de deslenhificação e rendimento depurado e, na hidrólise enzimática, a conversão dos polissacarídeos presentes na fração sólida resultante em açúcares simples é bastante inferior.

Pelo exposto anteriormente, torna-se necessário estudar o impacto da pré-extração da casca de *E. globulus*, segundo duas abordagens (uma com mistura etanol/água e outra com água), na desconstrução deste material lenhocelulósico, por cozimento kraft, e na hidrólise enzimática da pasta resultante. Desta forma, pretende-se seleccionar a combinação das condições processuais da pré-extração e do cozimento kraft que beneficiam a conversão de polissacarídeos em açúcares simples. De maneira a atingir estes objetivos foram consideradas as seguintes etapas:

- Caracterização química da casca e da madeira de *E. globulus*;
- Estudo da pré-extração da casca segundo duas abordagens diferentes;
- Caracterização química da casca extraída com etanol/água e da casca extraída com água;
- Avaliação do desempenho da casca tal e qual no cozimento kraft;
- Avaliação do desempenho da casca extraída no cozimento kraft;
- Caracterização química sumária da pasta de casca tal e qual e das pastas de casca extraída;
- Estudo da hidrólise enzimática da pasta de casca tal e qual e das pastas de casca extraída.

Por fim, de forma a perspetivar a exploração da casca de *E. globulus* para a produção de soluções de açúcares simples a uma escala industrial, realizar-se-á o estudo do balanço de massa global a cada sequência de processos de valorização.





## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

A metodologia experimental foi dividida em quatro seções: a caracterização química sumária da casca e da pasta de *E. globulus*, a extração dos compostos fenólicos presentes na casca de *E. globulus*, o cozimento da casca previamente extraída e da casca tal e qual, e o tratamento enzimático das pastas. A Figura 2.1 mostra o esquema experimental adotado neste trabalho.

Na primeira secção deste capítulo são descritas as metodologias utilizadas na caracterização química da casca tal e qual, da casca extraída e da pasta produzida por cozimento kraft; na segunda apresentam-se os procedimentos e as condições utilizadas para a extração da casca em diferentes meios; na terceira secção descreve-se a metodologia utilizada no cozimento kraft da casca previamente extraída e da casca tal e qual; por fim, na quarta secção indicam-se as metodologias utilizadas para a hidrólise enzimática das diferentes pastas, para a quantificação dos açúcares redutores e para a determinação da atividade enzimática da mistura comercial de enzimas utilizada.

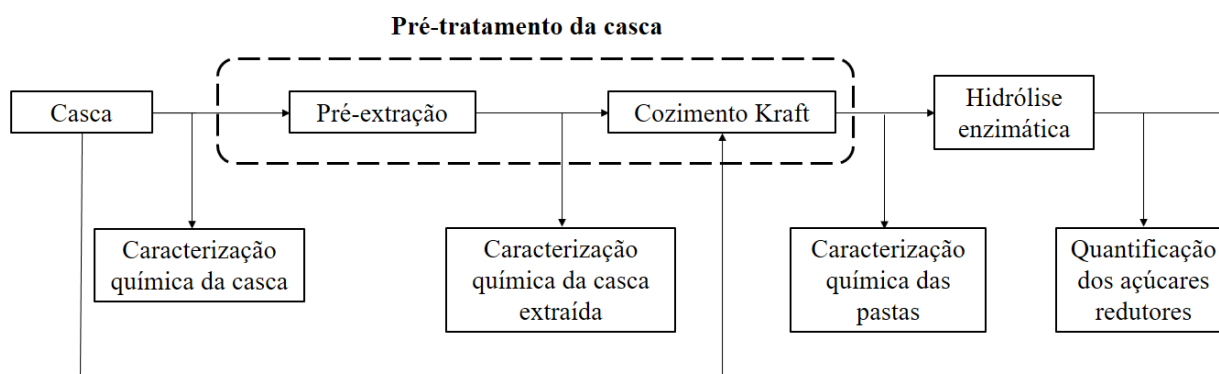


Figura 2.1 – Esquema do trabalho experimental realizado.

### 2.1. Caracterização química sumária da casca e da pasta de *E. globulus*

#### 2.1.1. Preparação da amostra para análise

A caracterização química, a extração de compostos fenólicos e o cozimento kraft foram realizados em amostras de casca seca de *E. globulus* provenientes da unidade de descasque da unidade industrial de Cacia da The Navigator Company, sendo que antes do seu descasque os toros de madeira foram lavados com água para facilitar este processo. A casca foi preparada para análise segundo a norma TAPPI T-257 cm-85. A casca foi seca à temperatura ambiente até humidade de equilíbrio, moída num moinho de martelos e crivada, seleccionando-se a fração granulométrica de 40 – 60 mesh. A pasta kraft foi seca à temperatura ambiente até atingir uma humidade de equilíbrio abaixo de 15%, antes de ser caracterizada.

### 2.1.2. Metodologia analítica

Na sua maioria os procedimentos seguidos para a caracterização química da casca encontram-se normalizados, tendo sido introduzidas algumas alterações que se encontram explicitadas na descrição dos métodos.

#### 2.1.2.1. Humidade

Para que a caracterização sumária da matéria-prima seja realizada numa base seca, foi determinada a humidade da amostra sempre que necessário, com base na norma NP EN 20638.

Foram pesadas 2 g de amostra para um copo previamente pesado, que foi depois colocado numa estufa a 105°C até se obter um peso constante.

#### 2.1.2.2. Cinzas

Tendo por base a norma TAPPI 211 om-02, cada cadinho previamente calcinado a 525±25°C é pesado antes e depois da adição de 2 g de amostra, sendo depois colocado na mufla 525±25°C. Para finalizar, os cadinhos com amostra incinerada foram retirados da mufla e colocados no exsiccador, sendo depois pesados para determinar o teor de cinzas na amostra.

Para a determinação do teor de cinzas na pasta o procedimento é semelhante, tendo por base a ISO 2144 e a incineração de 10g de pasta a 900±25°C.

#### 2.1.2.3. Extratáveis em etanol/tolueno

A quantificação de extratáveis em etanol/tolueno foi realizado simultaneamente à preparação de amostras para análises que exigem a extração prévia da casca, segundo o procedimento descrito na norma TAPPI T204 om-88, com algumas alterações.

Foi realizada a extração de 4 g de casca em Soxhlet com capacidade de 100 mL com 500 mL de solução etanol e tolueno na razão 1:2 (v/v), durante 4 horas. Terminada a extração, a amostra foi submetida a lavagem com etanol quente e em seguida com água quente, durante a filtração, para remover o tolueno remanescente. Os extratos recolhidos no balão do sistema foram evaporados e secos numa estufa a 105°C durante uma hora, de forma a serem quantificados gravimetricamente.

#### 2.1.2.4. Lenhina Klason e lenhina solúvel

De uma forma geral, neste método os polissacarídeos presentes na amostra de casca ou de pasta são hidrolisados até à sua solubilização por ação sucessiva de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado à temperatura ambiente e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído a fervente. Para este efeito 1 g de amostra de casca sem extratáveis foi hidrolisada a 20°C em 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%, seguidamente é diluída com água destilada até 300

mL e submetida a refluxo durante 2 horas. Para as amostras de pasta o procedimento é semelhante, diferenciando-se na adição de 40 mL da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2 g de pasta sem extratáveis e a diluição com água destilada até 1540 mL. A lenhina insolúvel é retida por filtração em cadinho de vidro sinterizado nº 2 e lavada com água quente até atingir um pH neutro, recolhendo-se o filtrado num balão de 1000 mL para ser utilizado na determinação do teor de lenhina solúvel.

Durante este processo uma parte da lenhina é solubilizada, sendo necessário quantificá-la uma vez que o conteúdo total de lenhina na amostra corresponde à soma da lenhina insolúvel (ou lenhina Klason) e da lenhina solúvel. Verifica-se também que a hidrólise ácida dos polissacarídeos, com ácido sulfúrico resulta na formação de produtos de degradação derivados de furfural e hidroximetilfurfural que se encontram solubilizados no filtrado e podem interferir na quantificação da lenhina solúvel.

No procedimento convencional, descrito na norma TAPPI 250, a lenhina solúvel é quantificada pela absorvância do filtrado proveniente do tratamento hidrolítico a um comprimento de onda de 205 nm. No entanto, com o intuito de diminuir a interferência causada pelos produtos de degradação dos polissacarídeos, a quantificação da lenhina solúvel realizou-se ajustando o pH de 20 mL do filtrado diluído para que se encontrasse entre 9 e 10. A esta solução adicionou-se NaBH<sub>4</sub> (50 mg) para reduzir os grupos cromóforos provenientes dos açúcares e, passados 20 minutos, acidificou-se a solução até ser atingido um pH inferior a 2. A solução obtida foi diluída com água destilada até 50 mL e efetuou-se a leitura da absorvância num espectrofotómetro a 280 nm utilizando como referência uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,8% sujeita ao mesmo tratamento que a amostra (norma TAPPI UM 250). O teor de lenhina solúvel ( $L_{Sol}$ ) foi determinado com base nas Equações 2.1 e 2.2.

$$L_{Sol} (\%) = \frac{C \times V_d}{V_a \times m_{amostra}} \quad 2.1$$

$$C_{LS} = \frac{Abs}{\varepsilon \times L} \quad 2.2$$

$C_{LS}$  – Concentração de lenhina solúvel na amostra, em g/L;

$Abs$  – Absorvância;

$\varepsilon$  – Absortividade específica (25,3 L g<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

$L$  – Comprimento da célula (1 cm);

$V_d$  – Volume final da diluição da amostra de filtrado ácido, em mL;

$V_a$  – Volume da amostra de filtrado ácido, em mL;

$m_{amostra}$  – Massa seca da amostra, em g.

### 2.1.2.5. Pentosanas

O teor de pentosanas na amostra de casca previamente extraída foi determinada segundo o método descrito na norma TAPPI T223 cm. As hemiceluloses sofrem hidrólise ácida na presença de HCl quente, resultando na formação de furfural a partir das unidades de xilose e de outras pentoses presentes na amostra. O furfural formado é recuperado por destilação e, reagindo com orcinol, forma um complexo corado que permite a sua quantificação por espectrofotometria de absorção visível. Para este efeito a 0,25 g de amostra adicionaram-se 20 g de NaCl e 100 mL de HCl 3,85 N e efetuou-se a destilação desta mistura para um balão em banho de gelo. Terminada a destilação, adicionaram-se 25 mL do reagente de orcinol a 5 mL do destilado obtido, manteve-se a mistura durante uma hora num banho termostático a 25°C e perpez-se o volume do balão com etanol, deixando-o no banho por mais uma hora. Por fim, leu-se a absorvância das soluções num espectrofotómetro UV-Vis a 630 nm, utilizando como branco uma solução de 5 mL de HCl 3,85N que sofreu o mesmo tratamento que o destilado, e obteve-se o teor de pentosanas na amostra através da curva de calibração indicada na Figura 2.2, elaborada de acordo com a metodologia indicada no Apêndice B.1.

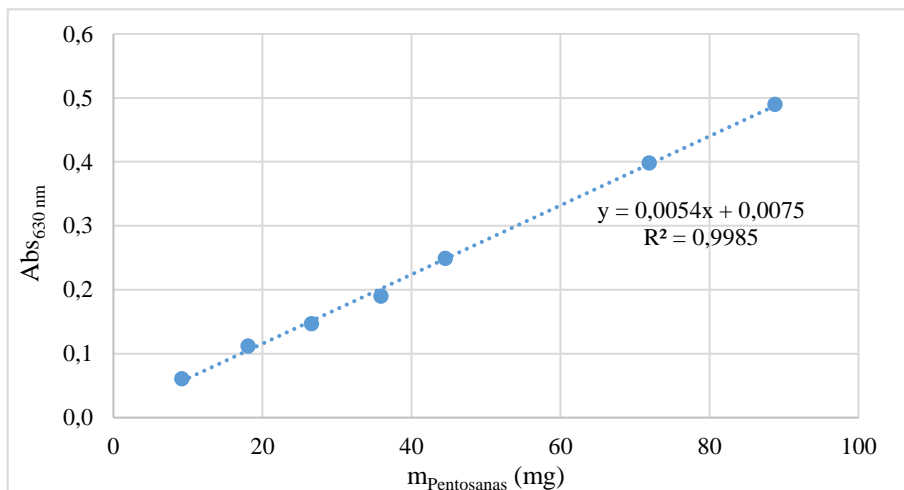


Figura 2.2 – Curva de calibração para o cálculo do teor de pentosanas.

A partir da absorvância lida a 630 nm pela curva de calibração obtém-se a massa de pentosanas na toma inicial de casca ou pasta, determinando-se o teor de pentosanas a partir da Equação 2.3.

$$\%Pentosanas = \frac{m_{Pentosanas}}{10 \times w} \quad 2.3$$

$m_{Pentosanas}$  – Massa de pentosanas na toma, em mg;

$w$  – Massa da toma em base seca, em g.

## 2.2. Extração da casca de *E. globulus*

Um dos objetivos deste trabalho é a avaliação da extração dos compostos polifenólicos presentes na casca de *E. globulus*, com diferentes níveis de severidade. Para este fim, a extração da casca foi realizada em dois meios diferentes (água e mistura etanol/água) e sob condições de operação (hidromódulo, duração e temperatura de extração) que maximizam a remoção daqueles compostos, segundo estudos anteriores [15, 21].

Para cada meio de extração foram realizados dois ensaios num digestor rotativo que permite a programação da duração e da temperatura da extração, utilizando casca de *E. globulus* com a mesma proveniência da casca utilizada na caracterização química sumária. Antes de se iniciarem os ensaios determinou-se a humidade da casca utilizada, de forma a calcular a massa de casca a pesar para garantir que se encontram 150 g de casca seca em cada digestor e determinar corretamente o volume de água a adicionar aos mesmos. As condições de extração estão indicadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Condições de operação para as extrações de casca em diferentes meios.

Meio de extração	HM	T <sub>patamar</sub> (°C)	Duração em patamar (min)	Rampa de aquecimento
Água		140	60	
Etanol/Água (52%/48%)	8	83	264	1°C/min

No final da extração, a casca extraída foi retirada dos digestores, lavada com 5 L de solução igual à utilizada na extração e centrifugada em seguida.

## 2.3. Cozimento kraft da casca de *E. globulus*

Após a extração da casca em dois meios diferentes, prosseguiu-se para o cozimento kraft da casca extraída e da casca tal e qual. O cozimento kraft da casca foi realizado no mesmo digestor rotativo utilizado nas extrações, pretendendo-se avaliar o impacto da extração prévia no cozimento kraft da casca em termos de índice kappa, rendimento em pasta e composição em polissacarídeos. As condições de cada cozimento foram definidas com base em estudos anteriores.

Para a casca tal e qual realizaram-se cozimentos com a mesma temperatura, mas duração em patamar diferentes e *alcali* ativo (AA) do licor de cozimento entre 22% e 28%. Relativamente à casca extraída tanto em água como em etanol/água, os cozimentos realizaram-se com apenas uma combinação de temperatura e duração em patamar variando apenas o *alcali* ativo (AA) do licor de

cozimento entre 22% e 28%. As variáveis temperatura e duração em patamar foram agrupadas numa só variável denominada fator H. As condições dos cozimentos realizados para as diferentes matérias-primas encontram-se sistematizadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Condições do cozimento da casca tal e qual e da casca extraída em etanol/água e em água.

	Casca tal e qual	Casca tal e qual e Casca extraída
AA (%)	22; 24; 26; 28	22; 24; 26; 28
T <sub>patamar</sub> (°C)	170	170
Duração em patamar (min)	180	60
HM	8	8
Índice Sulfureto (%)	28	28
Fator H	2983	1114

Antes de cada ensaio foi determinada a humidade de cada amostra de casca, de forma a garantir que eram utilizadas 150 g de casca seca em cada digestor. O licor de cozimento foi preparado por dissolução de quantidades previamente calculadas de NaOH, Na<sub>2</sub>S e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para cada ensaio, confirmando-se a composição do licor de cozimento de acordo com a norma SCAN-N 8:2, mais comumente designado por teste ABC. Neste teste através de três titulações sucessivas do licor preparado é possível determinar a concentração real dos compostos presentes no mesmo e fazer correções ao licor de forma a garantir que este tem a carga alcalina pretendida. Terminado o processo de cozimento no digestor rotativo a pasta produzida é crivada, centrifugada e lavada, numa sequência de processos utilizando o crivo, a centrífuga e o depurador apresentados na Figura 2.3, de forma a garantir a remoção de vestígios do licor negro da pasta e matéria-prima incozida.

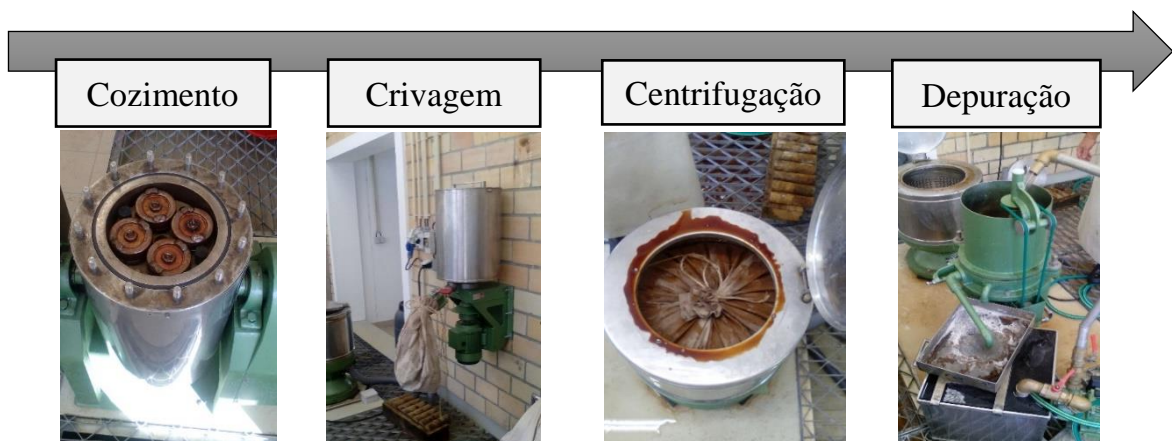


Figura 2.3 – Operações de cozimento, lavagem e crivagem das pastas kraft.

A pasta obtida bem como os incozidos retirados são pesados de forma a determinar a humidade da pasta, o rendimento total e o rendimento depurado do cozimento. Determina-se ainda o índice kappa (*IK*) da pasta para estimar o teor de lenhina residual na mesma e, conseqüentemente, o grau de deslenhificação atingido nos cozimentos. A proporcionalidade entre o *IK* e a lenhina total é tipicamente dada pela relação  $LT (\%) = 0,15 \times IK$ , embora esta relação possa ser influenciada pela espécie de madeira e pelo tipo de cozimento.

### 2.3.1. Determinação do índice kappa da pasta

O consumo de permanganato de potássio na oxidação da pasta, em condições especificadas, permite obter uma indicação do grau de deslenhificação da pasta. A determinação do índice kappa nas pastas realizou-se com base na Norma Portuguesa NP 3186/95.

Pesaram-se entre 10 a 13 g de cada amostra de pasta húmida e desintegrou-se cada toma de pasta em 500 mL de água destilada, até desaparecerem feixes e aglomerados de fibras, a uma temperatura de  $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Após a desintegração adicionou-se água até perfazer 790 mL e lavou-se o desintegrador. Num copo de 250 mL adicionou-se 100 mL de solução padronizada de  $\text{KMnO}_4$  0,02 M e 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M, aqueceu-se a mistura a  $25^\circ\text{C}$ , sendo esta depois adicionada à suspensão de fibra, lavando-se o copo com 10 mL de água destilada. Ao fim de 10 minutos exatos a reação é terminada com a adição de 20 mL de solução de KI 2 M e titulou-se o iodo livre com a solução padronizada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,2 M, utilizando uma solução de amido como indicador. Realizou-se um ensaio em branco procedendo da forma descrita, mas sem utilizar amostra.

O índice kappa (*IK*), expresso como um valor numérico, é dado através das Equações 2.4 e 2.5.

$$V_1 = \frac{(V_2 - V_3) \times C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}{0,02 \times 5} \quad 2.4$$

$$IK = \frac{V_1 \times d}{m} \quad 2.5$$

$V_2$  – Volume, em mL, da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  consumida no ensaio em branco;

$V_3$  – Volume, em mL, da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  consumida pela amostra de pasta;

$C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  – Concentração da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ;

$V_1$  – Volume, em mL, da solução de  $\text{KMnO}_4$  consumido na determinação;

$d$  – Fator de correção para o consumo de 50% de  $\text{KMnO}_4$  e depende do valor de  $V_1$  (Tabela fornecida em anexo à NP 3186);

$m$  – Massa, em g, da toma de ensaio de pasta absolutamente seca.

## 2.4. Tratamento enzimático das pastas de casca tal e qual e de casca extraída

### 2.4.1. Medição da atividade enzimática

Em estudos anteriores foi analisada a hidrólise enzimática de pasta de madeira de *E. globulus* e, conseqüentemente, a conversão de polissacarídeos em açúcares redutores utilizando diferentes misturas comerciais de enzimas [69, 72]. Os resultados destes estudos sugerem que a mistura comercial Cellic Ctec 2 permite atingir a maior conversão de polissacarídeos em açúcares redutores, de entre as misturas comerciais estudadas. As condições ótimas de atuação de Cellic Ctec 2 são: pH entre 4,5 e 5,0 e temperatura entre 45°C e 50°C.

A medição da atividade enzimática das celulasas presentes em Cellic Ctec 2 foi realizada com base na hidrólise da celulose, pelo método do papel de filtro [70]. Para este método utilizou-se ácido 3,5–dinitrosalicílico (DNS), tampão citrato de sódio 50 mM pH=4,8 e celulose como substrato, na forma de tiras de papel de filtro (1,0 x 6,0 cm) Whatman No. 1 ( $\approx$  50 mg) [70].

Para determinar a atividade enzimática de Cellic Ctec 2 as tiras de papel de filtro foram enroladas e colocadas em tubos de ensaio com tampa. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 1000  $\mu$ L de tampão citrato de sódio e colocaram-se os tubos num banho a 50 °C durante, aproximadamente, 10 minutos com o intuito de saturar as tiras de papel com tampão citrato e assim otimizar as condições para a mistura comercial Cellic Ctec 2.

Posteriormente, adicionou-se em cada tubo 500  $\mu$ L de Cellic Ctec 2 previamente diluída em tampão e incubaram-se os tubos de ensaio durante 60 minutos a 50 °C. Após esse período os tubos foram transferidos para um banho de água a 100°C onde permaneceram durante 5 minutos, sendo depois colocados num banho de água gelada durante 5 minutos. Depois do arrefecimento dos tubos adicionou-se 20 mL de água ultrapura em cada um e deixou-se repousar para garantir que não existiam sólidos suspensos. Este procedimento é também aplicado ao branco de reagente, 1500  $\mu$ L de tampão citrato, e aos padrões de controlo de enzima, 1000  $\mu$ L de tampão e 500  $\mu$ L de mistura comercial diluída, e de controlo de substrato, 1500  $\mu$ L de tampão adicionados a uma tira de papel de filtro.

O desenvolvimento de cor foi relacionado com a concentração de glucose através de leitura da absorvância de cada solução no espectrofotómetro UV-Vis a um comprimento de onda de 540 nm, contra o branco e as soluções de controlo, e através da curva de calibração da glucose (Figura 2.5). Foram efetuadas pelo menos duas diluições de Cellic Ctec 2 de forma a determinar a concentração que permite a libertação de  $2\pm 0,5$  mg de terminais redutores equivalentes a glucose [70]. A demonstração do cálculo da atividade enzimática encontra-se descrita no Apêndice B.4.



### 2.4.2. Hidrólise enzimática das pastas

A pasta húmida de casca tal e qual e as pastas húmidas de casca extraída com etanol/água e com água foram sujeitas a hidrólise enzimática. Efetuou-se também, como referência, a hidrólise enzimática de uma amostra de pasta de madeira de *E. globulus* fornecida pelo RAIZ - Instituto de Investigação da Floresta e do Papel, com IK 15,6 resultante de um cozimento a uma temperatura de patamar de 160°C durante 60 minutos, com alcalinidade 18%.

Com base em estudos anteriores, a hidrólise enzimática foi realizada com a mistura comercial Cellic Ctec 2, com atividade enzimática de 114,7 FPU/mL<sub>enzima</sub> e carga enzimática de 25 FPU/g<sub>HC</sub>, considerando como hidratos de carbono (HC) as pentosanas e a celulose quantificados na pasta [69]. Estabeleceu-se que o volume total do meio reacional de cada hidrólise é 1L e que à suspensão é adicionada uma solução enzimática de 200 mL, que contém um volume de Cellic Ctec 2 específico a cada ensaio. Este procedimento e cálculos associados ao mesmo encontram-se descritos no Apêndice B.2.

A pasta, suspensa em tampão citrato de sódio 50 mM pH=4,8 numa concentração inicial de 50 g<sub>a.s.</sub>/L, foi aquecida num banho à temperatura ótima de atuação das enzimas (50 °C) com agitação de 100 rpm, com um agitador mecânico com pá em forma de hélice (Figura 2.4). Adicionou-se à suspensão de pasta a solução enzimática previamente aquecida a 50°C e iniciou-se a contagem do tempo de reação, sendo que cada ensaio de hidrólise durou 24 h. Durante os ensaios, o recipiente onde decorria a hidrólise foi tapado para evitar perdas de hidrolisado por evaporação.

Ao longo de cada ensaio foram retiradas amostras de hidrolisado de 30 em 30 minutos até às 4 h e de 1 em 1 hora até às 8 h. Os ensaios ficaram a decorrer durante a noite retirando-se as últimas amostras às 23 h e às 24 h. Após a recolha de cada amostra, o hidrolisado foi colocado num banho a 100°C durante 5 minutos de forma a desnaturar a enzima e terminar a hidrólise devido ao choque térmico. No final das 24 h de ensaio o hidrolisado foi filtrado a vácuo para remover sólidos remanescente em suspensão e quantificar o volume final de hidrolisado.

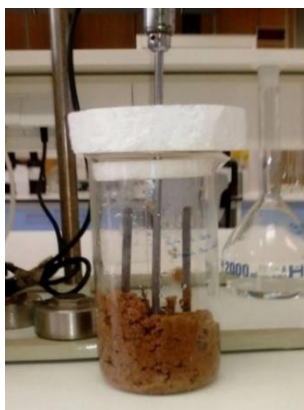


Figura 2.4 – Montagem para a hidrólise enzimática da pasta.

### 2.4.3. Método de análise dos açúcares redutores

A determinação quantitativa dos açúcares redutores presentes nas amostras de hidrolisado realizou-se através de um método colorimétrico baseado na redução do ácido 3,5–dinitrosalicílico (DNS) na presença de açúcares redutores.

Os açúcares redutores contêm na sua estrutura um grupo carbonilo livre, aldeído ou cetona, que se oxida facilmente em ácido carboxílico na presença de ácido 3,5–dinitrosalicílico aquecido em meio alcalino. Simultaneamente à oxidação do grupo carbonilo dos açúcares, ocorre a redução do ácido 3,5–dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, formando compostos castanho-vermelhados. Desta forma, o método colorimétrico DNS permite quantificar todos os hidratos de carbono redutores, de forma não discriminada, incluindo dissacarídeos para além de monossacarídeos de xilose e glucose. A intensidade da cor desenvolvida é relacionada com a concentração de açúcares redutores na amostra através de uma curva de calibração (Figura 2.5), que representa a absorvância média a um comprimento de onda de 540 nm em função da concentração de glucose.

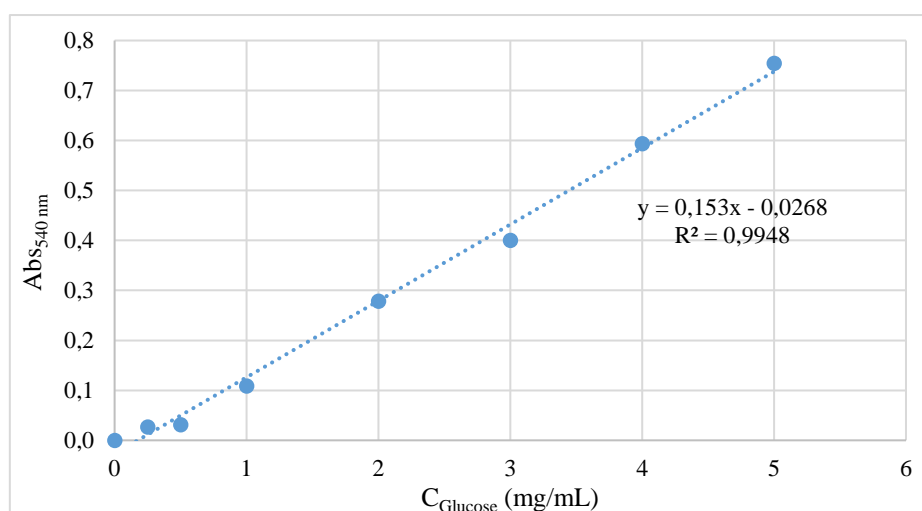


Figura 2.5 – Curva de calibração da glucose pelo método DNS.

Antes do método DNS as amostras de hidrolisado foram centrifugadas a 4500 rpm durante 5 minutos. Em seguida, num tubo de ensaio com tampa colocou-se 500  $\mu$ L de tampão citrato de sódio 50 mM e 500  $\mu$ L de amostra de hidrolisado diluída. Adicionou-se 3000  $\mu$ L de DNS e colocou-se o tubo num banho com água a ferver, durante 5 minutos exatos, e em seguida num banho de água gelada durante 5 minutos. Posteriormente, pipetaram-se 20 mL de água ultrapura para o tubo de ensaio e leu-se a absorvância da solução num espectrofotómetro UV-Vis num comprimento de onda de 540 nm, contra um branco de tampão citrato de sódio 50 mM que sofreu o mesmo tratamento que as amostras.

## Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de resultados

O desenvolvimento deste trabalho dividiu-se em cinco fases: a caracterização química sumária da casca de *E. globulus*, a extração da casca utilizando duas abordagens distintas, o cozimento da casca previamente extraída e da casca tal e qual, a caracterização química das pastas obtidas e, por fim, a hidrólise enzimática das pastas e consequente quantificação dos açúcares fermentáveis libertados, avaliando o impacto da pré-extração no cozimento e na sacarificação das pastas.

### 3.1. Caracterização química da casca e da madeira de *E. globulus*

A caracterização química da casca de *E. globulus* foi essencial para conhecer melhor a matéria-prima utilizada, pois a informação sobre a composição da casca que se encontra na literatura [10, 12, 13, 20] é bastante dispersa devido à variabilidade dos métodos de análise utilizados e à variação natural da espécie [25].

A análise química da casca foi realizada em base seca utilizando amostra moídas e crivadas até uma fração entre 40 e 60 mesh, após extração com etanol/tolueno. Para caracterizar a casca de *E. globulus* determinou-se experimentalmente a fração de cinzas, de extratáveis solúveis na mistura etanol/tolueno, de pentosanas, de lenhina Klason, também conhecida como lenhina insolúvel, e de lenhina solúvel. Para efeitos de comparação é também apresentada a caracterização química da madeira de *E. globulus*, previamente determinada pelo RAIZ - Instituto de Investigação da Floresta e do Papel. Compilando diferentes fontes bibliográficas [12, 13, 22, 25] obtém-se um intervalo referência para cada parâmetro estudado na caracterização da casca e da madeira, devido à variabilidade da sua composição química. Os resultados experimentais e os intervalos de referência encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Caracterização química sumária da casca tal e qual e da madeira de *E. globulus* e intervalos referência de cada parâmetro.

Parâmetro (%)	Intervalos de referência [12, 13, 22, 25, 26]			
	Casca tal e		Casca tal e	
	qual % m/m <sub>casca a.s.</sub>	Madeira % m/m <sub>madeira a.s.</sub>	qual % m/m <sub>casca a.s.</sub>	Madeira % m/m <sub>madeira a.s.</sub>
Cinzas	2,18	0,350	2,1 - 12,1	0,55 – 1,0
Extratáveis em etanol/tolueno	1,73	1,46	0,6 - 5,3	0,2 – 3,4
Lenhina Klason	19,0	20,4	-	-
Lenhina solúvel	1,63	3,80	-	-
Lenhina Total	20,6	24,2	16,9 - 34,1	17,8 – 24,8
Pentosanas	18,9	19,8	14,6 - 23,7	20,2 – 21,7
Celulose*	56,6	54,2	51,1 - 56,0	54,0 – 56,9

\* A fração de celulose nas amostras de *E. globulus* foi calculada por diferença entre 100% e o somatório da fração dos componentes determinados experimentalmente.

A composição química da casca e da madeira de *E. globulus* é concordante com os valores compilados de diferentes fontes, à exceção do teor de cinzas e do teor de pentosanas na madeira que são ligeiramente inferiores aos reportados na literatura [12, 13, 22, 25]. Comparando a composição química da casca e da madeira, determinada neste trabalho, verifica-se que o teor de cinzas e extratáveis na casca é superior ao seu teor na madeira. Por sua vez as frações de pentosanas e de lenhina na casca são ligeiramente inferiores à da madeira, enquanto que o teor de celulose é superior.

A fração de celulose na casca de *E. globulus* foi estimada por diferença entre 100% e o somatório das frações dos componentes quantificados (cinzas, extratáveis em etanol/tolueno, lenhina e pentosanas). A esta estimativa está associado um erro por excesso uma vez que, para além dos componentes quantificados experimentalmente, existem ainda frações de compostos fenólicos e outros polissacarídeos que não estão contabilizados. Ainda assim, a análise desta fração é necessária e justifica-se devido ao seu interesse enquanto fonte de polissacarídeos.

As hemiceluloses, a celulose e a lenhina são os compostos macromoleculares estruturais mais abundantes nos materiais lenhocelulósicos, justificando que de entre os parâmetros estudados estes apresentem as frações mais elevadas.

Para quantificar a lenhina na casca foi utilizado o método de Klason, no qual a lenhina é removida da matéria vegetal resultando numa fração insolúvel em meio ácido diluído, lenhina Klason, e numa fração solúvel, lenhina solúvel. Segundo o método de Klason a lenhina é separada dos polissacarídeos presentes através de reações de despolimerização dos mesmos originando monossacarídeos solúveis. Durante estas reações a estrutura da lenhina sofre alterações consideráveis

resultando na solubilização de uma parte da lenhina que deverá ser composta por produtos de degradação de baixo peso molecular e derivados hidrofílicos da lenhina. Determinando a fração de lenhina solúvel pelo procedimento convencional, que tem por base a leitura da absorvância do filtrado resultante do tratamento hidrolítico da casca a um comprimento de onda de 205 nm, obteve-se uma fração de 3,10%. Por outro lado, seguindo outro procedimento em que, através do ajuste do pH, da adição de borohidreto de sódio e da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 280 nm, se eliminam as interferências causadas pelos produtos de degradação da celulose e das hemiceluloses, obtendo-se uma fração de 1,47% de lenhina solúvel [71]. A diferença entre os resultados dos dois procedimentos confirma a presença no filtrado de produtos que interferem na quantificação da lenhina solúvel, reconhecendo-se que a eliminação destas interferências permite uma determinação mais rigorosa da fração total de lenhina presente na amostra.

### 3.2. Extração da casca de *E. globulus*

Neste trabalho é estudado um ciclo de valorização da casca de *E. globulus* que integra diferentes processos, como a extração de compostos fenólicos e o cozimento kraft da casca, previamente estudados e descritos na literatura individualmente [13, 15, 21]. Com esta abordagem pretende-se promover a integração da extração de compostos de valor acrescentado com atividade anti-oxidante e, simultaneamente, beneficiar a desconstrução por cozimento kraft da fração sólida resultante.

De acordo com trabalhos anteriores [15, 21], as condições de operação selecionadas para maximizar a seletividade da extração de compostos fenólicos dividem-se em duas abordagens: na primeira abordagem, a extração é realizada com a mistura etanol/água a uma temperatura de patamar de 83°C com duração de 264 minutos; na segunda abordagem a extração realiza-se com água a uma temperatura de patamar de 140°C com duração de 60 minutos.

Após a realização das duas abordagens da pré-extração da casca determinou-se o rendimento das extrações quantificando a massa de sólidos totais, não voláteis, em relação à massa de casca absolutamente seca. Na primeira abordagem o rendimento da extração foi 14,4%  $m/m_{\text{casca a.s.}}$ , enquanto que na segunda foi 12,0%  $m/m_{\text{casca a.s.}}$ . Estes resultados indicam que a pré-extração com etanol/água a 83°C durante 264 minutos permite remover uma maior quantidade de material presente na casca do que a pré-extração com água a 140°C durante 60 minutos. Em ambas as abordagens realizadas neste trabalho, o rendimento das extrações é superior ao previamente reportado na literatura, que indica um valor de 5,20%  $m/m_{\text{casca a.s.}}$  quando a extração é realizada de acordo com a primeira abordagem [21] e de 8,85%  $m/m_{\text{casca a.s.}}$  de acordo com a segunda abordagem [15]. O processo da extração realizado neste trabalho diferencia-se do descrito na literatura pela realização de lavagem extensiva, com solvente fresco, da fração sólida resultante da extração. Este passo

assegura que não ficou material extraído na casca e permite quantificar o rendimento em material extraído de forma mais rigorosa.

A caracterização química da casca após cada extração foi realizada em base seca em amostras de casca moída e crivada até uma fração granulométrica entre 40 e 60 mesh. Os resultados da fração de cinzas, extratáveis, lenhina, pentosanas e celulose em cada amostra de casca extraída e na casca tal e qual encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Caracterização química sumária da casca de *E. globulus* tal e qual e da casca extraída com etanol/água e com água.

Parâmetro (%)	Casca tal e qual	Casca extraída com	Casca extraída
	% m/m <sub>casca a.s.</sub>	etanol/água	com água
		% m/m <sub>casca_ext a.s.</sub>	% m/m <sub>casca_ext a.s.</sub>
Cinzas	2,18	2,04	1,78
Extratáveis em etanol/tolueno	1,73	0,375	1,69
Lenhina Klason	19,0	19,6	19,9
Lenhina solúvel	1,63	1,49	1,59
Lenhina Total	20,6	21,1	21,5
Pentosanas	18,9	19,3	17,7
Celulose*	56,6	57,1	57,3

\* A fração de celulose nas amostras de *E. globulus* foi calculada por diferença entre 100% e o somatório da fração dos componentes determinados experimentalmente.

Analisando a composição química das amostras de casca extraída verifica-se que, à semelhança da casca tal e qual, os compostos macromoleculares apresentam a maior contribuição para a composição química, enquanto que as frações de extratáveis e cinzas apresentam valores bastante inferiores.

De uma forma geral, as diferenças entre o conteúdo da casca extraída com etanol/água e da casca extraída com água são pouco significativas e podem dever-se a erros associados aos métodos analíticos utilizados na caracterização química. Ainda assim, as principais diferenças entre as amostras de casca extraída encontram-se no seu conteúdo de pentosanas e extratáveis uma vez que o teor de pentosanas é superior na casca extraída com etanol/água enquanto que o teor de extratáveis é maior na casca extraída com água. Estes resultados indicam que a mistura etanol/água nas condições de operação utilizadas (83°C, 264 minutos) favorece claramente a remoção de compostos normalmente isolados com etanol/tolueno, enquanto que a extração com água com condições de operação diferentes (140°C, 60 minutos) promove a remoção de pentosanas.

A extração da casca de *E. globulus* altera a fração relativa de cada componente quantificado na análise sumária da casca. Com o intuito de evidenciar o impacto de cada extração sobre cada

componente, numa base comparativa, determinou-se a fração removida de cada um durante a pré-extração. O método de cálculo, bem como a representação gráfica das frações removidas em cada abordagem da pré-extração encontram-se no Apêndice B.6.1.

Embora o objetivo da pré-extração da casca tal e qual seja a remoção de extratáveis, em especial compostos fenólicos, em ambos os casos registam-se frações de lenhina, pentosanas e de celulose removidas. Relativamente à lenhina, entre 12,5% (na extração com etanol/água) e 8,3% (na extração com água) é removida e, em ambos os meios de extração, dois terços da lenhina total removida corresponde a lenhina solúvel e apenas um terço representa a lenhina insolúvel. É importante ter presente que na quantificação da fração de lenhina na casca podem estar incluídos outros compostos, como compostos fenólicos, que embora não sejam lenhina reagem como tal no procedimento experimental aplicado.

A pré-extração com etanol/água tem maior impacto na remoção de extratáveis em etanol/tolueno do que a pré-extração com água, registando-se frações removidas de 81,5% e 14,3%, respetivamente. Por outro lado, na extração com água a fração de pentosanas removidas (17,5%) supera a remoção de extratáveis, enquanto que na extração com etanol/água a perda de pentosanas (12,4%) é mais baixa.

A análise da perda global de polissacarídeos (pentosanas e celulose), tendo presente que a fração de celulose determinada é apenas uma estimativa, demonstra que o impacto das duas extrações é semelhante (perda de 13,3% na extração com etanol/água e 12,4% na extração com água). No entanto, enquanto que na extração com etanol/água a perda de extratáveis (81,5%) é consideravelmente superior à de polissacarídeos (13,3%), na extração com água não há uma diferença significativa entre as duas frações removidas (a perda de extratáveis é 14,3% e a de polissacarídeos, 12,4%).

Resumindo, o estudo do efeito de ambas as extrações da casca na fração de cada componente permitiu apurar que: a pré-extração tem baixo impacto sobre os polissacarídeos; o impacto das duas abordagens nos polissacarídeos é semelhante pelo que estão, à partida, em igualdade como fonte de polissacarídeos para a produção de açúcares simples, considerando o âmbito deste trabalho; o impacto da pré-extração nos extratáveis em etanol/tolueno é superior na abordagem com etanol/água, que resultou numa remoção máxima de 81,5%, o que permitirá avaliar o impacto deste fator nos processos a jusante.

### **3.3. Cozimento kraft da casca de *E. globulus***

Em seguida, realizou-se o estudo do cozimento kraft da casca previamente extraída. Para estabelecer uma base de comparação em relação ao cozimento da casca extraída, realizou-se ainda o cozimento de casca tal e qual.

Pretende-se analisar o impacto da pré-extração na desconstrução da casca por cozimento kraft, em especial no teor de polissacarídeos da fração sólida resultante, mantendo presente a contribuição de cada sequência de processos na remoção de inibidores ou precursores de inibidores da sacarificação. Com este estudo procura-se selecionar a combinação adequada das condições de operação da pré-extração e das condições do cozimento kraft, de acordo com o enquadramento do trabalho.

### 3.3.1. Avaliação do desempenho da casca tal e qual no cozimento kraft

Com o intuito de selecionar as condições de cozimento kraft mais adequadas para a casca e para o propósito deste trabalho estudaram-se cozimentos com diferentes fatores H (combinação da duração e temperatura do processo) e alcalinidades. De forma a estudar o impacto da temperatura e da duração nos resultados do cozimento, com base em estudos anteriores [12] selecionou-se o fator H 2983, correspondente a um cozimento com temperatura de patamar de 170°C e duração de 180 minutos, e o fator H 1114, equivalente a um cozimento a 170°C durante 60 minutos. Para ambos os fatores H foram realizados cozimentos com *alcali* ativo (AA) 22%, 24%, 26% e 28%, para os quais se determinou o índice kappa (*IK*), o rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) e o teor de matéria-prima incozida (% Incozidos) indicados na Tabela 3.3. É necessário esclarecer que o rendimento depurado do cozimento de casca tal e qual é determinado pelo quociente entre a massa de pasta depurada e a massa de casca tal e qual alimentada, em base absolutamente seca.

Tabela 3.3 – Índice kappa (*IK*), rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) e teor de incozidos secos resultantes do cozimento de casca tal e qual com fatores H 2983 e 1114.

<b>Fator H</b>	<b>AA (%)</b>	22	24	26	28
2983	<b><i>IK</i></b>	12,2	11,9	10,9	11,5
	<b><math>\eta_{dep}</math> (%)</b>	43,1	43,5	43,0	42,8
	<b>Incozidos (%)</b>	0,06	0,13	0,08	0,18
1114	<b><i>IK</i></b>	18,5	14,9	13,2	12,6
	<b><math>\eta_{dep}</math> (%)</b>	49,1	46,3	44,9	40,6
	<b>Incozidos (%)</b>	1,02	0,03	0,18	0,99

Analisando os resultados obtidos para os cozimentos com fator H 2983 e com fator H 1114, verifica-se que com o aumento da alcalinidade do licor utilizado, o *IK* diminui ilustrando a diminuição do teor de lenhina residual na pasta e o aumento do grau de deslenhificação atingido. Em ambos os cozimentos, o rendimento depurado diminui com o aumento da alcalinidade devido à perda de lenhina e outros compostos solubilizados no licor durante o cozimento, verificando-se que este



efeito é mais significativo o cozimento com fator H 1114. O teor de material incozido resultante dos cozimentos encontra-se entre 0,03% e 1%.

De forma a comparar os cozimentos com fator H diferente do ponto de vista da seletividade dos cozimentos, a Figura 3.1 apresenta o rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) versus o índice kappa (IK) atingido.

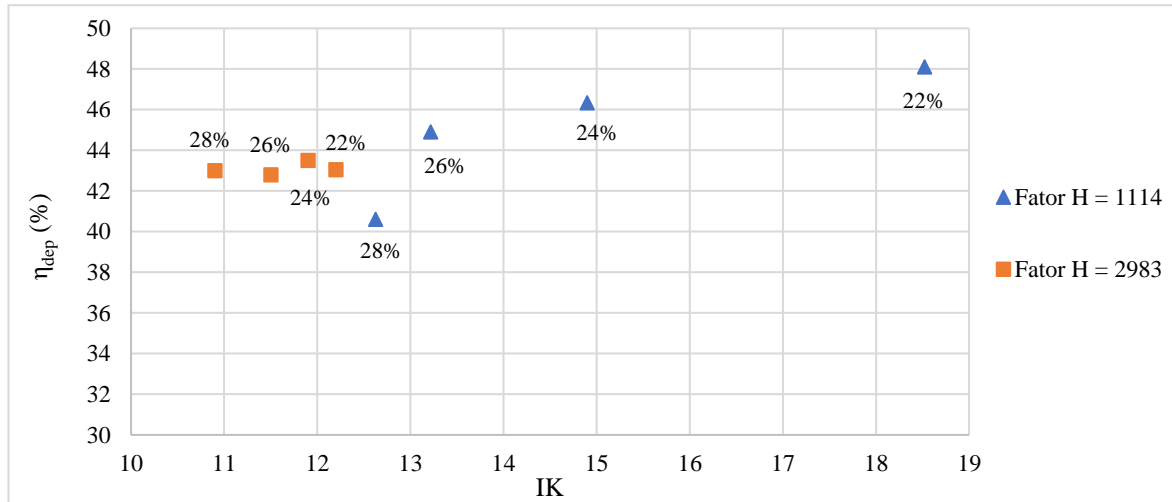


Figura 3.1 - Representação gráfica do rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) versus o índice kappa (IK) das pastas de casca tal e qual obtidas para diferentes cargas alcalinas (22%, 24%, 26% e 28%) e fatores H (2983 e 1114).

Comparando ambos os cozimentos observa-se que o aumento da duração em patamar (de 60 minutos, fator H 1114, para 180 minutos, fator H 2983) resultou no aumento da extensão da deslenhificação traduzido pela diminuição do IK, sem haver perdas de rendimento consideráveis.

Esta abordagem permite verificar que, ao aumento da alcalinidade do licor de cozimento, está associada não só a deslenhificação da casca, mas também a perda de polissacarídeos. Os resultados obtidos indicam também que, em cozimentos com condições de operação menos severas (fator H 1114), o efeito da alcalinidade é mais notório. Assim sendo, embora o grau de deslenhificação da casca seja mais baixo no cozimento com fator H 1114, há menos perdas de polissacarídeos. Desta forma, os cozimentos com fator H 1114 e alcalinidades entre 22% e 24% mitigam a degradação de polissacarídeos e resultam numa maior produtividade da casca de partida, considerando a aplicação desta como fonte de açúcares simples.

### 3.3.2. Avaliação do desempenho da casca extraída no cozimento kraft

Através do estudo do cozimento da casca tal e qual sob diferentes condições (fator H e alcalinidade) selecionou-se o conjunto que resulta no melhor compromisso entre o rendimento depurado e o grau deslenhificação. Assim sendo, o cozimento kraft das amostras de casca previamente extraída com água e com a mistura etanol/água foi realizado com fator H 1114 e

alcalinidades 22% e 24%. Após o cozimento de cada amostra de casca extraída determinou-se o índice kappa ( $IK$ ), o rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) e o teor de incozidos (%Incozidos) atingido em cada processo, cujos resultados se encontram na Tabela 3.4. Salienta-se que o rendimento depurado do cozimento de casca extraída foi determinado pelo quociente entre a massa de pasta depurada e a massa de casca extraída alimentada, em base absolutamente seca.

Tabela 3.4 – Índice kappa ( $IK$ ), rendimento depurado em pasta ( $\eta_{dep}$ ) e teor de incozidos secos resultantes do cozimento da casca extraída com etanol/água e com água, com fator H 1114 e alcalinidades 22% e 24%.

Fator H	AA (%)	Casca extraída com etanol/água		Casca extraída com água	
		22	24	22	24
1114	$IK$	13,1	12,1	11,4	10,9
	$\eta_{dep}$ (%)	49,7	49,5	49,7	46,0
	Incozidos (%)	0,06	0,18	0,55	3,49

A diminuição do  $IK$  com o aumento da carga alcalina encontra-se de acordo com o esperado, pois reflete a diminuição do teor de lenhina residual nas pastas. O rendimento depurado ( $\eta_{dep}$ ) também diminui com o aumento da carga alcalina. Contudo, em ambos os casos a diminuição é pouco significativa, à exceção do rendimento depurado do cozimento de casca extraída com água, pois com alcalinidade 24% obteve-se um rendimento de 46% devido a um elevado teor de incozidos. O teor de incozidos está compreendido entre 0,18% e 3,49%.

De forma a comparar o desempenho das amostras de casca extraída segundo duas abordagens diferentes com o da casca tal e qual quando sujeitas a um cozimento kraft sob condições semelhantes, elaborou-se o gráfico da Figura 3.2 onde é ilustrado o rendimento depurado ( $\eta_{dep}$ ) versus o índice kappa ( $IK$ ) de cada cozimento e o gráfico da Figura C. 1 do Apêndice C.3 que ilustra o rendimento depurado em função do teor de lenhina total nas pastas.

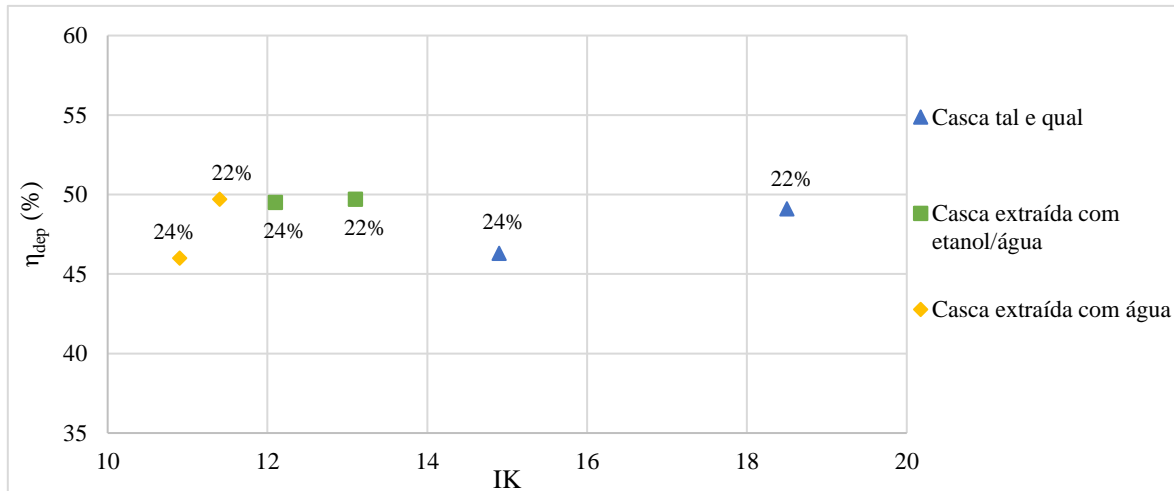


Figura 3.2 - Representação gráfica do rendimento depurado ( $\eta_{dep}$ ) e do índice kappa (IK) das pastas de casca extraída com etanol/água, com água e de casca tal e qual obtidas para cargas alcalinas de 22% e 24% e fator H 1114.

Na extração da casca que antecede o cozimento é utilizada casca tal e qual seca à temperatura ambiente, que resulta na libertação de pó e finos que acabam por ser removidos com a fração líquida. Esta perda leva a que, no cozimento, a remoção de material na forma de finos seja menor. Desta forma, o impacto dos finos no rendimento do cozimento da casca extraída é menor do que no cozimento da casca tal e qual. De um modo geral, a variação do rendimento depurado dos cozimentos de casca extraída é pouco significativo.

O estudo de seletividade ilustrado na Figura 3.2 permite verificar que, com o cozimento de casca extraída, obtêm-se pastas com IK inferior ao das pastas de casca tal e qual, sem afetar significativamente o rendimento. No cozimento de casca extraída com água os valores de IK obtidos (11,4 e 10,9) são inferiores aos do cozimento de casca extraída com etanol/água (13,1 e 12,1), indicando que cada pré-extração tem um impacto diferente no cozimento. Assim sendo, confirma-se que com a pré-extração seguida de cozimento kraft é possível atingir valores de IK mais baixos em cozimentos com a mesma carga alcalina e rendimento. De entre as duas sequências de valorização, a pré-extração com etanol/água é a que apresenta o melhor compromisso entre o aumento do grau de deslenhificação e a diminuição do rendimento.

Estudos anteriores, relativos ao cozimento da casca tal e qual com carga alcalina entre 22% e 28%, e ao cozimento da casca extraída com etanol/água com carga alcalina de 24% e 26%, apresentaram valores de IK superiores e de rendimento depurado inferiores aos obtidos neste trabalho [12]. No cozimento de casca tal e qual, os valores de IK reportados na literatura encontram-se entre 9,5 e 20,2, enquanto que os valores obtidos neste trabalho estão compreendidos entre 12,6 e 18,5. Relativamente ao rendimento depurado, os valores indicados na literatura encontram-se entre 42,7% e 45,9% e os resultados deste trabalho estão compreendidos entre 41,6% e 49,1%. Através desta

comparação, verifica-se que neste trabalho o grau de deslenhificação da casca tal e qual, nas mesmas condições de operação, foi superior registando-se também o aumento do rendimento depurado, que equivale a menor perda de polissacarídeos. No caso do cozimento de casca extraída com etanol/água apenas é possível comparar os resultados para a carga alcalina de 24%, verificando-se a mesma tendência descrita para a casca tal e qual, pois o IK apresentado na literatura (16,7) é superior ao determinado neste trabalho (12,1) e o rendimento depurado na literatura (46,2%) é inferior ao determinado (49,5%).

### 3.3.3. Caracterização química sumária das pastas de casca tal e qual e de casca extraída

As pastas resultantes do cozimento kraft, com alcalinidade 22% e 24%, da casca tal e qual e das amostras de casca extraída foram analisadas para quantificar o teor de lenhina Klason e solúvel, extratáveis em etanol/tolueno, pentosanas e celulose, com o intuito de avaliar o impacto da pré-extração na composição das pastas. Os resultados da caracterização química sumária das pastas encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Caracterização química sumária da pasta de casca tal e qual e das pastas de casca extraída.

	Pasta de casca tal e qual		Pasta de casca extraída com etanol/água		Pasta de casca extraída com água	
	(% m/m <sub>pasta a.s.</sub> )		(% m/m <sub>pasta a.s.</sub> )		(% m/m <sub>pasta a.s.</sub> )	
AA (%)	22	24	22	24	22	24
Cinzas	0,530	0,650	0,540	0,600	0,730	0,870
Extratáveis em etanol/tolueno	0,456	0,410	0,232	0,198	0,374	0,369
Lenhina Klason	0,915	0,609	0,860	0,600	0,671	0,466
Lenhina solúvel	0,550	0,570	0,630	0,680	0,390	0,390
Lenhina total	1,46	1,18	1,49	1,28	1,06	0,856
Pentosanas	18,5	17,4	14,6	14,0	10,6	10,8
Celulose*	79,0	80,4	83,1	83,9	87,3	87,2

\* A fração de celulose nas amostras de *E. globulus* foi calculada por diferença entre 100% e o somatório da fração dos componentes determinados experimentalmente.

Através do estudo da composição química das pastas de casca tal e qual e das pastas de casca extraída, verifica-se que o componente mais abundante nas mesmas é a celulose, cuja fração está compreendida entre 79,0% e 87,3%, seguida das pentosanas, com frações entre 18,5% e 10,6%. A combinação da fração de celulose e pentosanas permite estimar a fração de polissacarídeos presentes

nas pastas, verificando-se que esta se encontra entre 97,5% e 97,9% do teor mássico seco. A abundância de polissacarídeos nas pastas obtidas é uma mais valia para a produção de açúcares simples, ainda que a sua conversão por sacarificação possa ser prejudicada pela presença de inibidores.

O teor de pentosanas é a principal diferença entre as pastas de casca tal e qual e as pastas de casca extraída. Nas pastas de casca tal e qual a fração de pentosanas encontra-se entre 17,4% e 18,5%, enquanto que nas pastas de casca extraída com etanol/água a fração diminui para 14% e, no caso das pastas de casca extraída com água, diminui para 10%. Esta diferença está relacionada com a remoção de pentosanas que ocorre durante a pré-extração da casca e que é superior na abordagem com água do que na abordagem com etanol/água (página 45).

De entre os compostos macromoleculares, a lenhina é o menos abundante nas pastas devido à desconstrução da casca por cozimento kraft. A lenhina, os extratáveis em etanol/tolueno e as cinzas são compostos vestigiais na composição das pastas e constituem menos de 2,5% da sua composição química.

Comparando a composição química da pasta de casca tal e qual com a composição das pastas de casca extraída, verifica-se que o teor de extratáveis nas pastas de casca extraída, em especial na pasta de casca extraída com etanol/água, é inferior ao teor na pasta de casca tal e qual. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que na pré-extração da casca com etanol/água 81,5% dos extratáveis em etanol/tolueno são removidos.

De entre as pastas estudadas, a pasta de casca extraída com água apresenta o teor de lenhina mais baixo, indicando que na sequência de pré-extração com água seguida de cozimento kraft é atingido o maior grau de deslenhificação, à semelhança do que se conclui pela análise dos valores de IK (página 48). Analisando os valores de IK e do teor de lenhina total para os diferentes cozimentos, verifica-se que existem pastas com um teor de lenhina residual semelhante, mas diferentes IK. De acordo com a literatura [43–45] o material oxidável quantificado pelo método de determinação do IK, inclui não só lenhina residual mas também ácidos hexenurónicos formados a partir das xilanas sob as condições do cozimento kraft.

De uma forma geral, não se verificam diferenças significativas na composição das pastas com o aumento da alcalinidade do cozimento. A escolha da fração sólida a utilizar no tratamento enzimático tem por base um compromisso entre a composição química da fração sólida e os custos associados a processos com carga alcalina elevada. Por este motivo, as pastas obtidas em cozimentos com a alcalinidade mais baixa, 22%, são as escolhidas para o passo seguinte deste trabalho onde a pasta é o substrato no tratamento enzimático para produção de açúcares simples.

O cozimento kraft da casca altera a fração relativa de cada componente quantificado na análise sumária da pasta. Com o intuito de detetar e analisar alterações que a pré-extração tenha induzido na casca e que afetam o processo subsequente de cozimento kraft, determinou-se a fração removida de cada componente, numa base comparativa de casca extraída. O cálculo e a representação dos resultados da fração removida de cada componente durante o cozimento encontram-se no Apêndice B.6.2.

Comparando as frações removidas no cozimento kraft verifica-se que a remoção de componentes da casca tal e qual difere da remoção da casca previamente extraída. Esta diferença deve-se não só ao impacto da pré-extração na remoção dos componentes da casca durante o cozimento, mas também ao impacto que a extração tem por si nos componentes da casca e que já foi analisada através dos dados da Tabela 3.2.

Os resultados obtidos indicam que no cozimento kraft da casca previamente extraída há maior remoção de pentosanas do que no cozimento da casca tal e qual. Quando a matéria-prima do cozimento se trata de casca tal e qual a remoção de pentosanas encontra-se entre 52,9% e 58,3%, enquanto que no cozimento de casca extraída com água, a remoção está compreendida entre 70,4% e 72,0%, e é superior à fração removida no cozimento de casca extraída com etanol/água, que se encontra entre 62,5% e 64,2%. Os resultados sugerem que a pré-extração, nomeadamente a pré-extração com água, aumenta a propensão das hemiceluloses para a sua remoção durante o cozimento kraft, o que se pode dever a alterações da acessibilidade das mesmas causadas pela pré-extração.

A diferença entre a remoção de lenhina no cozimento da casca tal e qual e no cozimento da casca extraída é pouco significativa. De uma forma geral, a fração de lenhina removida encontra-se entre 96,5% e 98,2%, indicando que a pré-extração da casca não tem um impacto significativa neste parâmetro.

Relativamente à remoção de celulose nos cozimentos (considerando que o teor de celulose é uma estimativa calculada por diferença entre 100% e o somatório da fração dos componentes quantificados experimentalmente), observa-se o comportamento contrário ao das pentosanas, uma vez que entre 33% e 35% da celulose da casca tal e qual é removida durante o cozimento kraft, mas apenas 27% é removida da casca previamente extraída com etanol/água e 24% removida da casca extraída com água, sugerindo que a pré-extração diminui a perda de celulose durante o cozimento.

Determinando a fração total de polissacarídeos removidos no cozimento, observa-se que no cozimento da casca tal e qual são removidos entre 37,9% e 40,9% dos polissacarídeos, para a casca extraída com etanol/água a remoção ronda os 36,6% e na casca extraída com água entre 35,3% e 40,1% dos polissacarídeos são removidos. Estes resultados indicam que o pré-processamento da casca de *E. globulus* por extração de compostos polares diminui o impacto do cozimento nos polissacarídeos da casca, embora a diminuição seja pouco significativa. Os resultados sugerem que,

com a combinação da pré-extração seguida do cozimento kraft, o teor de polissacarídeos na fração sólida não sofre alterações consideráveis.

### **3.4. Tratamento enzimático das pastas de casca tal e qual e de casca extraída**

Concluído o estudo da pré-extração da casca de *E. globulus* e do seu impacto na desconstrução deste material lenhocelulósico por cozimento kraft, avançou-se para o último passo do ciclo de valorização estudado neste trabalho, a sacarificação da pasta resultante do processamento da casca. Através do estudo da conversão dos polissacarídeos presentes nas pastas estudadas neste trabalho em açúcares simples pretende-se verificar se a implementação da pré-extração resulta na melhoria do rendimento e cinética da hidrólise enzimática em relação a estudos anteriores [11]. Em estudos anteriores, obteve-se uma conversão de 3,1% para a casca processada por cozimento kraft, de 59,1% para a casca previamente extraída com etanol/água, de 67,8% quando a carga enzimática da hidrólise é aumentada, de 30,9% quando se aumenta a carga alcalina do cozimento e melhora a lavagem da pasta e de 76,1% quando o teor de sólidos iniciais na hidrólise enzimática é reduzido e o controlo do pH é mais rigoroso.

Nesta fase realizou-se a hidrólise enzimática da pasta de casca tal e qual e das pastas de casca extraída com etanol/água e com água resultantes do cozimento kraft com carga alcalina de 22%, uma vez que estas pastas ilustram o melhor compromisso entre a composição química e os custos associados à alcalinidade do processo. Para efeitos de comparação foi ainda realizada a hidrólise enzimática de uma amostra de pasta de madeira de *E. globulus* laboratorial, com IK 15,6 resultante de um cozimento a uma temperatura de patamar de 160°C durante 60 minutos, com alcalinidade 18%.

A composição química das pastas utilizadas na hidrólise enzimática, determinada anteriormente (página 50), indica que: na pasta de casca tal e qual a fração de polissacarídeos é 97,5%, a fração de lenhina é 1,46% e a de extratáveis é 0,46%; na pasta de casca extraída com etanol/água, a fração de polissacarídeos é 97,7%, a de lenhina é 1,49% e a de extratáveis é 0,23%; por fim, na pasta de casca extraída com água a fração de polissacarídeos é 97,8%, a de lenhina é 1,06% e da extratáveis é 0,37%.

Nos ensaios de hidrólise enzimática foi utilizada a mistura comercial de enzimas Cellic Ctec 2 com uma carga enzimática de 25 FPU/g<sub>HC</sub> de acordo com estudos anteriores, que indicam que estas condições permitem atingir uma maior conversão dos polissacarídeos em monossacarídeos [69]. O volume de Cellic Ctec 2 utilizado em cada ensaio foi calculado segundo a metodologia descrita no Apêndice B.2, obtendo-se os valores indicados no Apêndice C.1.1. A atividade enzimática de Cellic Ctec 2 é de 114,7 FPU/mL<sub>enzima</sub> e foi determinada com base nos cálculos descritos no Apêndice B.4.

Em todos os ensaios realizados a temperatura e o pH da suspensão mantiveram-se dentro do intervalo de valores ótimos de atuação da enzima (temperatura entre 45°C e 50°C, e pH entre 4,5 e 5,0). No final de cada ensaio de hidrólise enzimática quantificou-se o volume final de hidrolisado, cujos resultados se encontram no Apêndice C.1.1, e determinou-se a concentração de açúcares redutores ( $C_{AR}$ ) nas amostras de hidrolisado retiradas ao longo das 24 horas de duração do ensaio. Para esta quantificação recorreu-se ao método DNS, através da equação da curva de calibração da glucose (Figura 2.5), da absorvância média de cada amostra a um comprimento de onda de 540 nm ( $Abs_{540\text{ nm}}$ ) e do fator de diluição de cada amostra ( $FD$ ). O exemplo de cálculo da concentração de açúcares redutores encontra-se no Apêndice B.3 e os resultados do cálculo encontram-se no Apêndice C.1.2.

A representação da concentração de açúcares redutores ( $C_{AR}$ ) ao longo da duração dos ensaios realizados para a pasta de madeira, de casca tal e qual e de casca extraída, utilizando o método colorimétrico DNS, encontra-se na Figura 3.3.

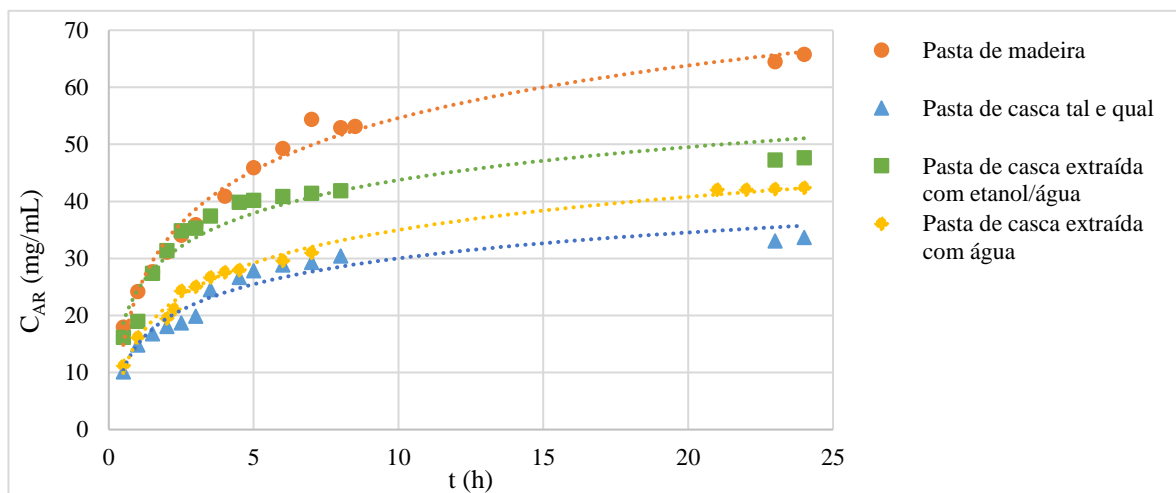


Figura 3.3 - Concentração de açúcares redutores ( $C_{AR}$ ) presentes no hidrolisado das pastas de madeira, de casca tal e qual, de casca extraída com etanol/água e da casca extraída com água.

De entre os ensaios realizados, a hidrólise da pasta de madeira de *E. globulus* atinge a maior concentração de açúcares redutores (65,8 mg/mL) e a pasta de casca tal e qual a menor concentração (33,7 mg/mL). Relativamente às pastas de casca extraída, a concentração de açúcares redutores é maior no hidrolisado da pasta de casca extraída com etanol/água (47,7 mg/mL) do que no hidrolisado da pasta de casca extraída com água (42,4 mg/mL).

Com base nas concentrações de açúcares redutores representadas no gráfico da Figura 3.3 e no volume final de hidrolisado de cada ensaio, calculou-se a massa de açúcares redutores produzidos ( $m_{AR}$ ) e a conversão dos polissacarídeos em açúcares redutores ( $x$ ) ao longo de cada ensaio, através



da metodologia de cálculo detalhada no Apêndice B.5, cujos resultados se encontram no Apêndice C.1.2.

Analisando a massa de açúcares redutores produzidos em cada ensaio, verificou-se que na hidrólise enzimática da pasta de madeira produz-se a maior massa de açúcares (55,9 g) enquanto que a hidrólise da pasta de casca tal e qual produz a menor massa (27,7 g). Por sua vez, no ensaio com pasta de casca extraída com etanol/água produziram-se 39,1 g de açúcares redutores, enquanto que com a pasta de casca extraída com água foram produzidas 33,9 g. De uma forma geral, estes resultados indicam que as alterações induzidas na composição química da casca pela pré-extração beneficiam a produção de açúcares redutores.

Na Figura 3.4 encontra-se a representação gráfica da conversão de açúcares redutores em função da duração dos ensaios de hidrólise, para cada pasta estudada.

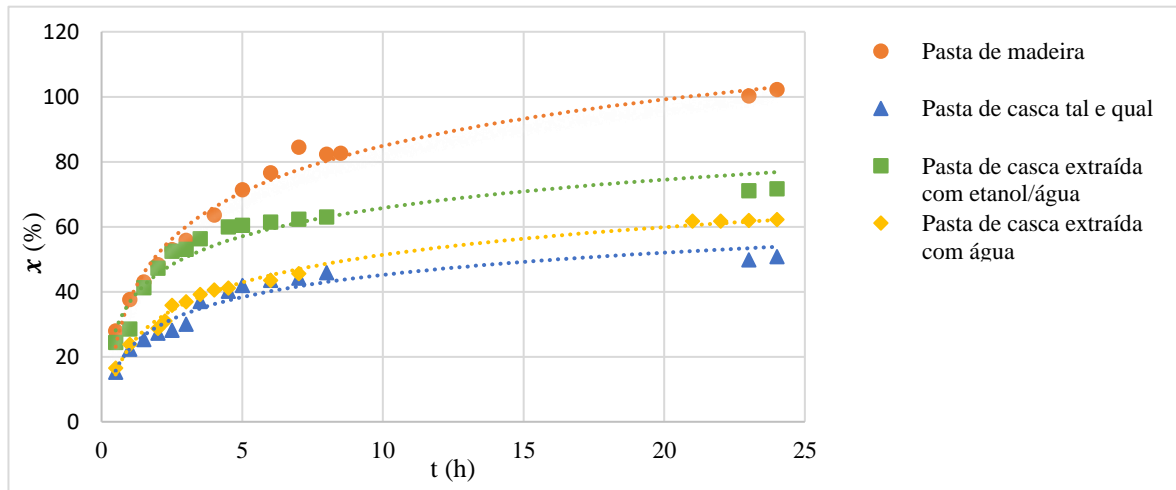


Figura 3.4 - Conversão de açúcares redutores ( $x$ ) ao longo da hidrólise enzimática de pasta de madeira, de casca tal e qual, de casca extraída com etanol/água e de casca extraída com água.

Analisando o gráfico da Figura 3.4, verifica-se que a hidrólise enzimática da pasta de madeira está próxima de ser completa e apresenta a maior conversão de polissacarídeos em açúcares redutores de entre todos os ensaios realizados. O valor da conversão da pasta de madeira é superior a 100% devido ao erro por excesso associado ao método DNS que para além de quantificar glucose e xilose, deteta também dissacarídeos presentes nas amostras de hidrolisado.

Na hidrólise enzimática da pasta de casca extraída com etanol/água e da pasta de casca extraída com água, a conversão em açúcares redutores é de 71,7% e 62,3%, respetivamente, verificando-se que em ambos os casos a hidrólise não é completa. No entanto, a conversão resultante da hidrólise de pasta de casca extraída é superior à conversão para a pasta de casca tal e qual, 50,8%. Estes resultados sugerem que as alterações induzidas pela pré-extração na composição da fração sólida (remoção de compostos fenólicos e de outros compostos solúveis em etanol/água ou em água)

melhoram o acesso dos polissacarídeos às enzimas, permitindo atingir uma maior conversão em açúcares redutores, em comparação com a pasta de casca tal e qual.

No ponto 3.2, através do estudo do impacto de ambas as abordagens de pré-extração nos componentes da casca, concluiu-se que a principal diferença entre as abordagens é a remoção de extratáveis em etanol/tolueno que é significativamente superior na pré-extração com etanol/água, sendo que a fração de compostos normalmente isolados com etanol/tolueno engloba também os compostos fenólicos presentes na casca. Através dos ensaios de hidrólise enzimática verificou-se que a sequência de valorização que integra a pré-extração com etanol/água resulta numa maior conversão em açúcares redutores de entre as sequências de processamento da casca estudadas. Desta forma, os resultados mostram que a hidrólise enzimática de frações sólidas com menor teor de extratáveis resultam numa maior conversão de polissacarídeos em açúcares redutores, sugerindo que a presença de extratáveis, nomeadamente compostos fenólicos, na casca de *E. globulus* pode estar na origem do menor rendimento de hidrólise observado para a pasta de casca não extraída.

Em estudos anteriores [11], o cozimento da casca tal e qual realizado com fator H 1114 (170°C, 60 minutos) e alcalinidade 26% produziu uma pasta com IK 18,4 cuja hidrólise enzimática apresentou uma conversão em açúcares redutores de apenas 3,1%. Por outro lado, neste trabalho o cenário selecionado para comparação dos resultados da hidrólise enzimática foi o cozimento com fator H 1114 e alcalinidade 22%, que resultou numa pasta de casca tal e qual com IK 18,5 e conversão de polissacarídeos em açúcares redutores de 50,8%. Comparando as duas abordagens, verifica-se que a pasta produzida com alcalinidade superior apresenta uma conversão em açúcares redutores significativamente mais baixa, sugerindo que a alcalinidade está na origem de compostos na pasta que inibem a hidrólise.

Relativamente à pasta de casca previamente extraída com etanol/água, na literatura [11] é reportado o seu cozimento nas mesmas condições utilizadas para a casca tal e qual, resultando numa pasta com IK 16,4 cuja conversão de polissacarídeos em açúcares redutores é de 59,1%. Neste trabalho, realizou-se a lavagem extensiva da casca com etanol/água após a extração e aplicando as mesmas condições de cozimento enunciadas acima obteve-se uma pasta com IK 13,1 e conversão em açúcares redutores de 71,7%. Desta forma, a diferença entre a conversão em açúcares redutores entre este trabalho e a literatura deve-se não só ao impacto da alcalinidade do cozimento, pois uma maior alcalinidade pode estar na origem da formação de compostos na pasta que inibem a hidrólise, mas também ao impacto do teor de lenhina na pasta e da lavagem extensiva da casca após extração, na sua digestibilidade face à hidrólise enzimática. De forma geral, este trabalho resultou numa maior conversão de polissacarídeos em açúcares redutores, tanto a partir de casca tal e qual como a partir de casca extraída com etanol/água, do que os estudos anteriores.

### 3.5. Balanço global ao processo

Neste trabalho foram estudadas diferentes seqüências de processos para a produção de soluções de açúcares simples a partir da casca de *E. globulus*. Cada seqüência integra a pré-extração da casca não só para beneficiar a sua desconstrução por cozimento kraft, mas também para maximizar a extração de compostos fenólicos totais, com o intuito de valorizar todas as correntes deste processo. De uma forma geral as seqüências de processos englobam a pré-extração da casca segundo duas abordagens diferentes, o cozimento kraft da casca previamente extraída (com fator H 1114 e alcalinidade 22%) e a hidrólise enzimática das pastas resultantes.

Ao longo deste trabalho realizou-se a análise do impacto de cada processo nos componentes da casca, em especial no teor de polissacarídeos. Assim, torna-se necessário o estudo integrado dos diferentes processos de forma a determinar o impacto global de cada seqüência de valorização nos polissacarídeos. Desta forma, com o intuito de adquirir um ponto de vista abrangente sobre a capacidade máxima de produção de açúcares redutores a partir de casca de *E. globulus*, realizou-se um balanço de massa global a cada seqüência de processos considerando uma produção anual de casca de 100 000 ton numa fábrica de média dimensão.

No balanço de massa global, para extrapolar a massa de açúcares redutores produzida anualmente ( $m_{AR}$ ) contabilizou-se a fração de polissacarídeos removidos na pré-extração ( $\%R_{Ps,ext}$ ) e no cozimento kraft ( $\%R_{Ps,coz}$ ), bem como a conversão ( $x$ ) dos mesmos em açúcares na hidrólise enzimática. Para o cálculo da massa de açúcares redutores produzidos, determinou-se também a massa de glucose ( $m_{Glc,pasta}$ ) e de xilose ( $m_{Xil,pasta}$ ) disponíveis na pasta. Através do balanço global de cada seqüência de valorização determinou-se a massa de polissacarídeos removida da casca na pré-extração ( $m_{Ps,ext}$ ) e no cozimento kraft ( $m_{Ps,coz}$ ), bem como a massa que permanece na fração sólida após cada processo ( $m_{Ps,casca ext}$  e  $m_{Ps,pasta}$ ), expressas em toneladas por ano (ton/ano). A metodologia de cálculo utilizada encontra-se no Apêndice B.7.

Os resultados do balanço de massa a cada seqüência de valorização, focando os polissacarídeos, encontram-se nos diagramas de processo da Figura 3.5, Figura 3.6 e Figura 3.7.

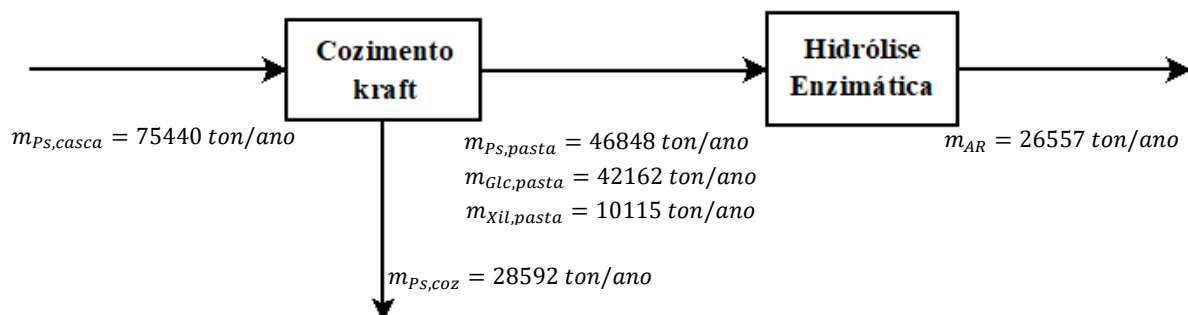


Figura 3.5 – Diagrama do processo de cozimento kraft de casca tal e qual de *E. globulus* seguido de hidrólise enzimática.

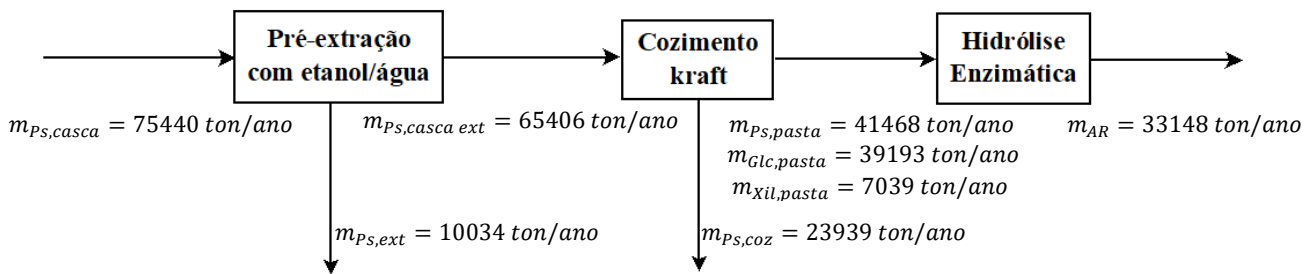


Figura 3.6 - Diagrama da sequência de pré-extração com etanol/água da casca de *E. globulus* e cozimento kraft, seguido de hidrólise enzimática.

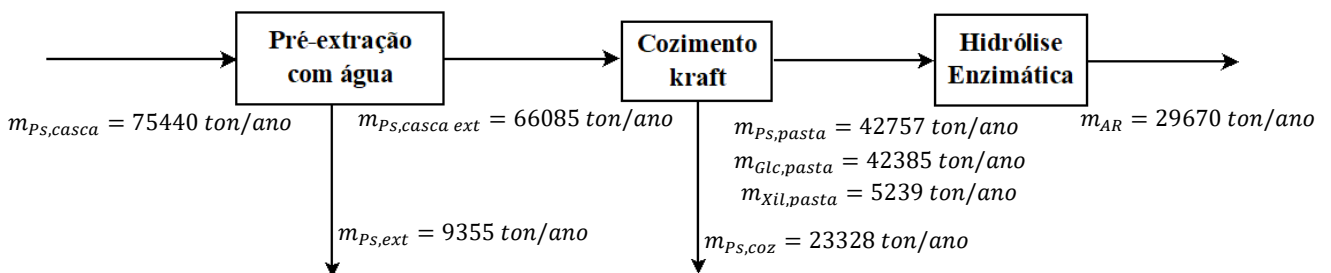


Figura 3.7 - Diagrama da sequência de pré-extração com água da casca de *E. globulus* e cozimento kraft seguido de hidrólise enzimática.

O processo de desconstrução da casca por cozimento kraft sem extração prévia, representado no diagrama da Figura 3.5, remove 28592 ton/ano de polissacarídeos por 100000 ton/ano de casca inicial. Por sua vez, na hidrólise enzimática da pasta resultante do cozimento, que permite obter uma solução final com concentração de açúcares de 33,7 mg/mL, produzem-se 26557 ton/ano de açúcares redutores.

Na pré-extração da casca com etanol/água, cujo diagrama se encontra na Figura 3.6, são removidas 10034 ton/ano de polissacarídeos, seguindo-se o cozimento kraft da casca extraída onde a remoção de polissacarídeos é 23939 ton/ano. Embora a combinação da massa de polissacarídeos removidos na pré-extração com etanol/água e no cozimento supere a remoção dos mesmos no cozimento de casca tal e qual (Figura 3.5), a sequência de valorização que integra esta abordagem da pré-extração produz uma solução final com maior concentração de açúcares, 47,7 mg/mL, e uma maior quantidade de açúcares redutores, 33148 ton/ano por 100000 ton/ano de casca inicial. Na literatura é reportado que a pré-extração com etanol/água produz 1900 ton/ano de compostos fenólicos totais por 100000 ton/ano de casca [21], indicando que é possível integrar a valorização do extrato desta pré-extração na sequência de processos.

Por fim, analisou-se o balanço de massa à sequência de valorização da casca que integra a pré-extração com água seguida do cozimento kraft e da hidrólise enzimática da fração sólida

resultante (Figura 3.7). Os resultados do balanço de massa indicam que na pré-extração da casca com água são removidos anualmente 9355 ton de polissacarídeos, e no cozimento kraft da casca extraída são removidos 23328 ton/ano. Desta forma, na hidrólise enzimática da pasta resultante obtém-se uma solução final com concentração de açúcares de 42,4 mg/mL, que culmina na produção de 29670 ton/ano de açúcares redutores por 100000 ton/ano de casca.

Ao conciliar os resultados do balanço de massa a cada sequência de processos, verifica-se que a sequência que integra a pré-extração com etanol/água produz mais 25% de açúcares redutores do que o processamento da casca apenas por cozimento kraft e mais 12% do que a sequência de pré-extração com água seguida de cozimento. Os resultados do balanço de massa indicam que a pré-extração, em particular a pré-extração com etanol/água, beneficia a hidrólise enzimática das pastas resultantes do cozimento kraft.

Com este estudo é possível concluir que a combinação do processo de pré-extração da casca com etanol/água, a uma temperatura de patamar de 83°C com duração de 264 minutos, com o cozimento kraft, com fator H 1114 e carga alcalina de 22%, embora não tenha um impacto considerável na remoção de polissacarídeos na desconstrução por cozimento kraft, permite remover inibidores ou precursores de inibidores da hidrólise enzimática, nomeadamente compostos fenólicos, resultando na maior produção anual de açúcares a partir de casca de *E. globulus*.



## Capítulo 4 - Conclusão

A casca de *Eucalyptus globulus* é um subproduto comum proveniente do processamento de troncos de madeira para a produção de pasta de papel. A sua composição química apresenta não só polissacarídeos e lenhina, mas também um elevado teor de extratáveis polares, em especial compostos fenólicos. Por este motivo, tem vindo a ser estudado o aproveitamento da casca no contexto de biorefinaria, nomeadamente para a produção de soluções de açúcares, e para extração de compostos fenólicos presentes na mesma devido à sua atividade anti-oxidante. Estudos anteriores [11] indicam que a casca de *E. globulus* sujeita a desconstrução por cozimento kraft apresenta baixa digestibilidade por hidrólise enzimática, impulsionando o estudo de diferentes pré-processamentos da casca, como a extração prévia de compostos polares, de forma a identificar quais as condicionantes deste material face à sacarificação. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo o estudo do impacto da pré-extração da casca de *E. globulus* na sua desconstrução por cozimento kraft e na hidrólise enzimática da fração sólida resultante, tendo em vista o aproveitamento da fração sólida para a produção de açúcares simples.

A casca de *E. globulus* utilizada neste trabalho apresenta uma composição química semelhante à publicada na literatura para esta espécie [12, 13, 22, 25]. Em relação à madeira da mesma espécie a casca possui, em média, maior teor de extratáveis em etanol/tolueno, cinzas e celulose.

A pré-extração da casca foi realizada segundo duas abordagens que maximizam a extração de compostos fenólicos totais e diferem no meio de extração (mistura etanol/água ou água), na temperatura de patamar (83°C ou 140°C) e na duração (264 ou 60 minutos) [15, 21]. O estudo do impacto de cada extração nos componentes da casca permitiu concluir que ambas as abordagens têm baixo impacto nos polissacarídeos, removendo entre 12,4% e 13,3% dos polissacarídeos presentes na casca. Contudo as abordagens diferem no impacto sobre os extratáveis, sendo que a remoção máxima, 81,5%, ocorre na pré-extração com etanol/água. Seguidamente, a casca previamente extraída foi sujeita a cozimento kraft, com fator H 1114 e alcalinidade de 22% e 24%. Concluiu-se que se obtêm valores de IK mais baixos em cozimentos com a mesma carga alcalina e rendimento depurado quando este processo é precedido pela pré-extração e que o cozimento de casca extraída com etanol/água apresenta o melhor compromisso entre o aumento do grau de deslenhificação e a diminuição do rendimento.

Os resultados da caracterização química das frações sólidas resultante das sequências de processamento da casca (pré-extração seguida de cozimento) e do cozimento da casca tal e qual, sugerem que a pré-extração de compostos polares aumenta a propensão das hemiceluloses para a sua remoção durante o cozimento, pois 52,9% das hemiceluloses são removidas no cozimento da casca

tal e qual enquanto que no cozimento de casca extraída removem-se 62,5%, no caso da casca extraída com etanol/água, e 70,4%, no caso de casca extraída com água, o que se pode dever a alterações da acessibilidades das mesmas durante a pré-extração. A fração de lenhina e de polissacarídeos não difere significativamente entre as diferentes pastas de casca extraída e as pastas de casca tal e qual, sendo que estas se diferenciam pelo seu teor de extratáveis em etanol/tolueno que na pasta de casca extraída se encontra entre 0,23% e 0,37%, e na pasta de casca tal e qual é 0,46%.

Por fim, as frações sólidas resultantes das sequências de valorização foram sujeitas a hidrólise enzimática e determinou-se a concentração das soluções de açúcares produzidas, a massa de açúcares redutores em cada solução e a conversão de polissacarídeos em açúcares redutores. Verificou-se que as sequências de processos que integram a pré-extração permitem obter soluções de açúcares mais concentradas e uma maior conversão de polissacarídeos em açúcares redutores, 71,7% para a pré-extração com etanol/água e 62,3% para a pré-extração com água, enquanto que a sequência que integra o cozimento da casca tal e qual resultou numa conversão de 50,8%. Estes resultados sugerem que as alterações induzidas na composição química da casca durante a pré-extração com etanol/água, nomeadamente a remoção de extratáveis, beneficiam o acesso dos polissacarídeos às enzimas.

O impacto global de cada sequência de valorização da casca nos polissacarídeos e a produção anual de açúcares redutores foram contabilizados para uma unidade industrial com produção anual de 100 000 ton de casca, através de um balanço de massa global. Verificou-se que a sequência que integra a pré-extração com etanol/água produz a maior quantidade de açúcares redutores, 33 148 ton/ano. Esta produção é superior, em 12%, à produção na sequência que integra a pré-extração com água e superior, em 25%, à produção da sequência que integra apenas o cozimento kraft da casca.

Resumindo, com este trabalho concluiu-se que na pré-extração com etanol/água, a 83°C durante 264 minutos, é possível integrar a extração de compostos polares na sequência de valorização da casca, induzindo simultaneamente alterações na sua composição química, nomeadamente a remoção de 81,5% dos extratáveis em etanol/tolueno. Estas alterações aumentam a digestibilidade da fração sólida resultante do cozimento kraft face à hidrólise enzimática, permitindo produzir a solução final com maior concentração de açúcares, 47,7 mg/mL, e a maior quantidade de açúcares redutores por 100000 ton/ano de casca, de entre as sequências de processos estudados.

Futuramente, devem ser realizados cozimentos kraft da casca tal e qual e da casca extraída sob diferentes condições de operação, nomeadamente de carga alcalina, de forma a otimizar as condições do cozimento com o intuito de determinar o limite de IK das pastas que compromete a sua hidrólise enzimática. Relativamente à hidrólise enzimática, sugere-se o estudo do impacto da carga enzimática e da duração do ensaio na conversão de polissacarídeos presentes na pasta de casca em



açúcares simples. Por último sugere-se a realização do estudo comparativo da viabilidade económica de cada sequência de processos.



## Bibliografia

- [1] P. Kumar, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, P. Stroeve, P. Kumar, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, e P. Stroeve, "Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production," *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2009, **48**, p. 3713–3729.
- [2] M. Balat, "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review," *Energy Convers. Manag.*, 2011, **52**, p. 858–875.
- [3] L. Wang, M. Sharifzadeh, R. Templer, e R. J. Murphy, "Bioethanol production from various waste papers: Economic feasibility and sensitivity analysis," *Appl. Energy*, 2013, **111**, p. 1172–1182.
- [4] M. A. Lima, G. B. Lavorente, H. K. da Silva, J. Bragatto, C. A. Rezende, O. D. Bernardinelli, E. R. DeAzevedo, L. D. Gomez, S. J. McQueen-Mason, C. A. Labate, e I. Polikarpov, "Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of *Eucalyptus* bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production – part 1," *Biotechnol. Biofuels*, 2013, **6**, p. 1–17.
- [5] V. Menon e M. Rao, "Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept," *Prog. Energy Combust. Sci.*, 2012, **38**, p. 522–550.
- [6] E. Goes, "Os Eucaliptos". Publicação da Portucel, 1985.
- [7] M. Monrroy, J. Garcia, R. T. Mendoca, J. Baeza, e J. Freer, "Kraft pulping of *Eucalyptus globulus* as a pretreatment for bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation," *J. Chil. Chem. Soc.*, 2012, **57**, p. 1113–1117.
- [8] H. Sixta, "Chemical pulping," em "Pulp handbook"; H. Sixta (Ed.), WILEY-VCH, Lenzing, Austria, 2006, p. 185–365.
- [9] C. Chirat, D. Lachenal, e A. Dufresne, "Biorefinery in a kraft pulp mill: from bioethanol to cellulose nanocrystals," *Cellul. Chem. Technol.*, 2010, **44**, p. 59–64.
- [10] P. C. Pinto, D. V. Evtuguin, e C. P. Neto, "Effect of structural features of wood biopolymers on hardwood pulping and bleaching performance," *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005, **44**, p. 9777–9784.
- [11] A. Gaspar, B. Ferreira, C. Freire, C. Fonseca, F. Barreiro, F. Carvalheiro, F. Gírio, J. Sardinha, J. Bordado, J. Ataíde, J. R. Rodrigues, P. C. R. Pinto, e S. Marques, "Conceção de produtos de base biológica como precursores para a bioindústria de síntese química e de biomateriais a partir de fontes renováveis lenhocelulósicas," Relatório final do projeto Bioblocks, 2015.
- [12] P. C. R. Pinto, C. Oliveira, C. A. E. Costa, e A. E. Rodrigues, "Performance of side-streams from *Eucalyptus* processing as sources of polysaccharides and lignins by kraft delignification," *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2016, **55**, p. 516–526.
- [13] I. Miranda, J. Gominho, e H. Pereira, "Incorporation of bark and tops in *Eucalyptus globulus* wood pulping," *BioResources*, 2012, **7**, p. 4350–4361.
- [14] G. Vázquez, J. Santos, M. S. Freire, G. Antorrena, e J. González-Álvarez, "Extraction of antioxidants from *Eucalyptus (Eucalyptus globulus)* bark," *Wood Sci. Technol.*, 2012, **46**, p. 443–457.
- [15] P. C. R. Pinto, G. Sousa, F. Crispim, A. J. D. Silvestre, e C. Pascoal Neto, "*Eucalyptus globulus* bark as source of tannin extracts for application in leather industry," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2013, **1**, p. 950–955.
- [16] "Boletim Estatístico da Indústria Papeleira Portuguesa," CELPA, 2015. Disponível: <http://www.celpta.pt/>.
- [17] "Pasta de Papel." Disponível: <http://www.thenavigatorcompany.com/Pasta-e-Papel/Pasta-de-Papel>. [Consultado: 04-Ag-2017].

- [18] J. S. Pereira, S. Linder, M. C. Araújo, H. Pereira, T. Ericsson, N. Borrvalho, e L. C. Leal, "Optimization of biomass production in *Eucalyptus globulus* plantations," *Biomass Prod. by fast-growing trees*, 1989, **166**, p. 101–121.
- [19] "Floresta Sustentável." Disponível: <http://www.thenavigatorcompany.com/Sustentabilidade/Floresta-Sustentavel>. [Consultado: 04-Ag-2017].
- [20] E. de Jong e G. Jungmeier, "Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries," em "Industrial Biorefineries & White Biotechnology"; A. Pandey, R. Hofer, C. Larroche, M. Taherzadeh, e M. Nampoothiri (Ed.), Elsevier B.V., 2015, p. 3–33.
- [21] I. Mota, P. C. R. Pinto, C. Novo, G. Sousa, O. Guerreiro, A. R. Guerra, M. F. Duarte, e E. Rodrigues, "Extraction of polyphenolic compounds from *Eucalyptus globulus* bark: process optimization and screening for biological activity," *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2012, **51**, p. 6991–7000.
- [22] I. Miranda, J. Gominho, I. Mirra, e H. Pereira, "Fractioning and chemical characterization of barks of *Betula pendula* and *Eucalyptus globulus*," *Ind. Crops Prod.*, 2013, **41**, p. 299–305.
- [23] G. Henriksson e H. Lennholm, "Cellulose and Carbohydrate Chemistry," em "Wood Chemistry and Wood Biotechnology"; W. de Gruy., G. Gellerstedt, M. Ek, e G. Henriksson (Ed.), W. de Gruyter, Stockholm, 2009, p. 72–98.
- [24] D. Fengel e G. Wegener, "Wood: chemistry, ultrastructure, reactions"; W. de Gruyter, N. Y., 1984, p. 200–214.
- [25] H. Pereira, "Variability in chemical composition of plantation eucalypts (*Eucalyptus globulus* Labill.)," *Wood Fiber Sci.*, 1988, **20**, p. 82–90.
- [26] D. Neiva, L. Fernandes, S. Araújo, A. Lourenço, J. Gominho, R. Simões, e H. Pereira, "Chemical composition and kraft pulping potential of 12 eucalypt species," *Ind. Crops Prod.*, 2015, **66**, p. 89–95.
- [27] T. Umezawa, "Chemistry of Extractives," em "Wood and Cellulosic Chemistry"; N. Shiraishi e D. N. S. Hon (Ed.), Marcel Dekker Inc., N. Y., 2001, p. 213–234.
- [28] H. Imamura, "Contribution of extractives to wood characteristics," em "Natural Products of Woody Plants"; J. Rowe (Ed.), Springer, Berlim, 1989, p. 843–860.
- [29] J. A. F. Gardner e W. E. Hillis, "The influence of extractives on the pulping of wood," em "Wood Extractives and Their Significance to the Pulp and Paper Industries"; W. E. Hillis (Ed.), Academic Press Inc., Melbourne, 1962, p. 367–385.
- [30] G. Vázquez, E. Fontenla, J. Santos, M. S. Freire, J. González-Álvarez, e G. Antorrena, "Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalypts (*Eucalyptus globulus*) bark extracts," *Ind. Crops Prod.*, 2008, **28**, p. 279–285.
- [31] S. A. O. Santos, C. S. R. Freire, M. R. M. Domingues, A. J. D. Silvestre, e C. P. Neto, "Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* labill. bark by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, p. 9386–9393.
- [32] A. J. D. Silvestre, C. P. Neto, e C. S. R. Freire, "Componentes lipofílicos da madeira de *Eucalyptus globulus*: composição e comportamento durante a produção de pasta de papel," *O Papel*, 2005, **66**, p. 5–16.
- [33] R. M. A. Domingues, G. D. A. Sousa, C. M. Silva, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, e C. P. Neto, "High value triterpenic compounds from the outer barks of several *Eucalyptus* species cultivated in Brazil and in Portugal," *Ind. Crops Prod.*, 2011, **33**, p. 158–164.

- [34] R. M. A. Domingues, G. D. A. Sousa, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, e C. P. Neto, "Eucalyptus globulus biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds," *Ind. Crops Prod.*, 2010, **31**, p. 65–70.
- [35] C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, C. P. Neto, e J. A. S. Cavaleiro, "Lipophilic extractives of the inner and outer barks of *Eucalyptus globulus*," *Holzforschung*, 2002, **56**, p. 372–379.
- [36] P. C. R. Pinto, I. F. Mota, J. M. Loureiro, e A. E. Rodrigues, "Membrane performance and application of ultrafiltration and nanofiltration to ethanol/water extract of *Eucalyptus* bark," *Sep. Purif. Technol.*, 2014, **132**, p. 234–243.
- [37] E. Conde, E. Cadahia, M. Garcíavallejo, e F. Tomasbarberan, "Low molecular weight polyphenols in wood and bark of *Eucalyptus globulus*," *Wood Fiber Sci.*, 1995, **27**, p. 379–383.
- [38] D. Fengel e G. Wegener, "Wood: chemistry, ultrastructure, reactions"; W. de Gruyter, N. Y., 1984, p. 66-97.
- [39] E. Sjöstrom, "Wood Chemistry, Fundamentals and Applications"; Academic Press Inc., N. Y., 1981, p. 51-59.
- [40] E. Sjöstrom, "Wood Chemistry, Fundamentals and Applications"; Academic Press Inc., N. Y., 1981, p. 68-82.
- [41] D. Fengel e G. Wegener, "Wood: chemistry, ultrastructure, reactions"; W. de Gruyter, N. Y., 1984, p. 106-117.
- [42] A. A. Shatalov, D. V. Evtugin, e C. P. Neto, "Caracterização das *O*-acetil-(4-*O*-metilglicurono)xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis*", *Carbohydr. Res.*, 1999, **320**, p. 93–99.
- [43] D. Fengel and G. Wegener, "Wood: chemistry, ultrastructure, reactions"; W. de Gruyter, N. Y., 1984, p. 132 - 167.
- [44] C. A. E. Costa, P. C. R. Pinto, e A. E. Rodrigues, "Evaluation of chemical processing impact on *E. globulus* wood lignin and comparison with bark lignin," *Ind. Crops Prod.*, 2014, **61**, p. 479–491.
- [45] G. Henriksson, "Lignin," em "Wood Chemistry and Wood Biotechnology"; G. Gellerstedt, M. Ek, e G. Henriksson (Ed.), W. de Gruyter, Stockholm, 2009, p. 126–136.
- [46] C. J. Biermann, "Handbook of pulping and papermaking"; Academic Press Inc., N. Y., 1996.
- [47] B. Yang, Z. Dai, S.-Y. Ding, e C. E. Wyman, "Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass," *Biofuels*, 2014, **2**, p. 421–449.
- [48] T. Werpy e G. Petersen, "Top Value Added Chemicals From Biomass," *U.S. Department of Energy*, 2004.
- [49] A. Azapagic, "Sustainability considerations for integrated biorefineries," *Trends Biotechnol.*, 2013, **32**, p. 1–4.
- [50] S. T. Moe, K. K. Janga, T. Hertzberg, M.-B. Hägg, K. Øyaas, e N. Dyrset, "Saccharification of lignocellulosic biomass for biofuel and biorefinery applications - A renaissance for the concentrated acid hydrolysis?," *Energy Procedia*, 2012, **20**, p. 50–58.
- [51] R. P. C. R. Bura e W. E. M. A. Berlin, "Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2007, **108**, p. 67–93.
- [52] M. Yoshida, Y. Liu, S. Uchida, K. Kawarada, Y. Ukagami, H. Ichinose, S. Kaneko, e K. Fukuda, "Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2008, **72**, p. 805–810.
- [53] X. Zhao, K. Cheng, e D. Liu, "Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **82**, p. 815–827.

- [54] A. Romani, H. A. Ruiz, F. B. Pereira, L. Domingues, e J. A. Teixeira, "Effect of hemicellulose liquid phase on the enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* wood," *Biomass Convers. Biorefinery*, 2014, **4**, p. 77–86.
- [55] R. S. Teixeira, A. S. Silva, R. O. Moutta, V. S. Ferreira-Leitão, R. R. Barros, M. Ferrara, e E. P. Bon, "Biomass pretreatment: a critical choice for biomass utilization via biotechnological routes," *BMC Proc.*, 2014, **8**.
- [56] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, e M. J. Negro, "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review," *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, p. 4851–4861.
- [57] S. G. Allen, D. Schulman, J. Lichwa, M. J. Antal, M. Laser, e L. R. Lynd, "A Comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber," *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2001, **40**, p. 2934–2941.
- [58] F. Lopez, J. C. Villar, M. J. Diaz, e R. Marti, "Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*," *Biomass and bioenergy*, 2012, **42**, p. 97–106.
- [59] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, e M. Ladisch, "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass," *Bioresour. Technol.*, 2005, **96**, p. 673–686.
- [60] D. Clayton, D. Einspahr, D. Easty, W. Lonsky, E. Malcolm, T. McDonough, L. Shroeder, e N. Thompson, "Alkaline Pulping," em "Pulp and Paper Manufacture", Vol. 5; T. Grace, B. Leopold, E. Malcolm e M. Kocurek (Ed.), TAPPI e CPPA, 1983, p.1.
- [61] J. Li e G. Gellerstedt, "The contribution to kappa number from hexenuronic acid groups in pulp xylan," *Carbohydr. Res.*, 1997, **302**, p. 213–218.
- [62] M. M. Costa e J. L. Colodette, "The impact of kappa number composition on *Eucalyptus* kraft pulp bleachability," *Brazilian J. Chem. Eng.*, 2007, **24**, p. 61–71.
- [63] P. C. R. Pinto, C. Oliveira, C. A. Costa, A. Gaspar, T. Faria, J. Ataíde, e A. E. Rodrigues, "Kraft delignification of energy crops in view of pulp production and lignin valorization," *Ind. Crop. Prod.*, 2015, **71**, p. 153–162.
- [64] J. Gierer, "Chemical aspects of kraft pulping," *Wood Sci. Technol.*, 1980, **14**, p. 241–266.
- [65] Y. H. P. Z. Ye, J. Hong, e X. Ye, "Cellulase Assays," *Biofuels: Methods and Protocols*, 2009, **581**, p. 213–231.
- [66] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Van Zyl, e I. S. Pretorius, "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, **66**, p. 506–577.
- [67] S. Malherbe e T. E. Cloete, "Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications," *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 2002, **1**, p. 105–114.
- [68] J. M. S. Cabral, M. R. Aires-Barros, e M. Gama, "Engenharia Enzimática"; Lidel, Lisboa, 2003, p. 250.
- [69] E. Cabral, "Estudo da hidrólise da pasta kraft com diferentes enzimas," Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2014.
- [70] B. Adney e J. B. Nrel, "Measurement of Cellulase Activities," 2008.
- [71] S. Yasuda, K. Fukushima, e A. Kakehi, "Formation and chemical structures of acid-soluble lignin I: sulfuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood," *J. Wood Sci.*, 2001, **47**.
- [72] C. Almeida, "Estudo do comportamento fermentativo de *Actinobacillus succinogenes* para a produção de ácido succínico e ácido láctico," Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2015.

## Apêndices

### A. Figuras Auxiliares

#### A.1. Reações da lenhina no processo de cozimento kraft

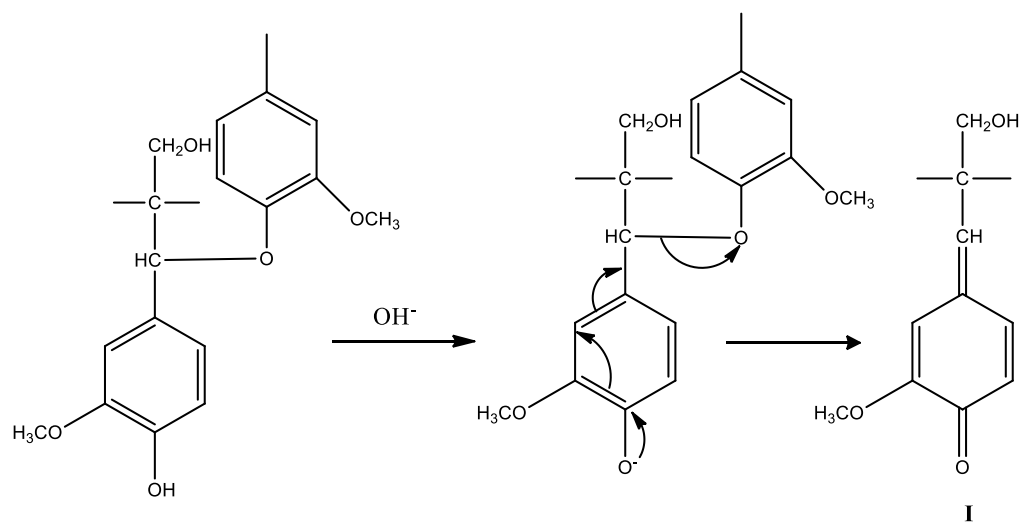


Figura A. 1 - Formação do intermediário derivado quinona (I) por clivagem da ligação  $\alpha$ -O-4 em unidades fenólicas. Adaptado de [24].

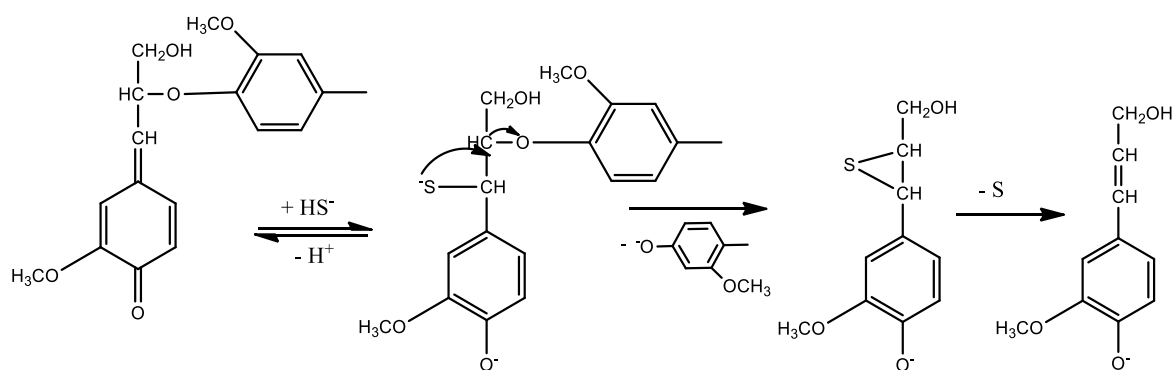


Figura A. 2 - Mecanismo de clivagem das ligações  $\beta$ -O-4 entre unidade fenólicas em meio alcalino. Adaptado de [24].

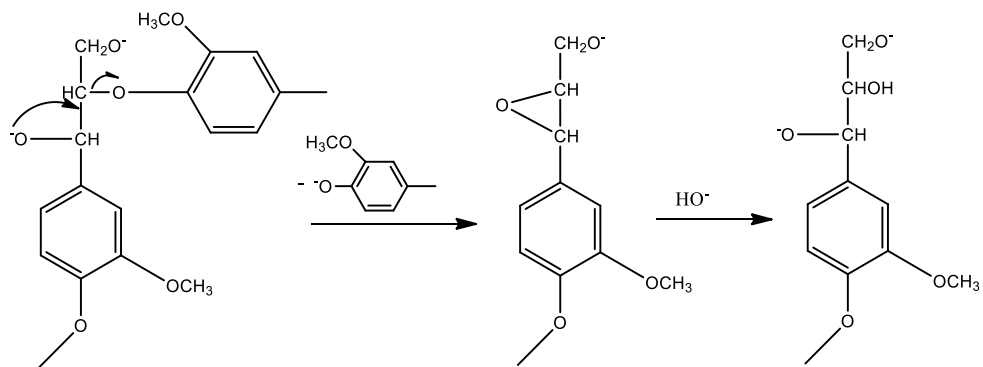


Figura A. 3 - Mecanismo da clivagem das ligações  $\beta$ -O-4 entre unidades não-fenólicas. Adaptado de [24].

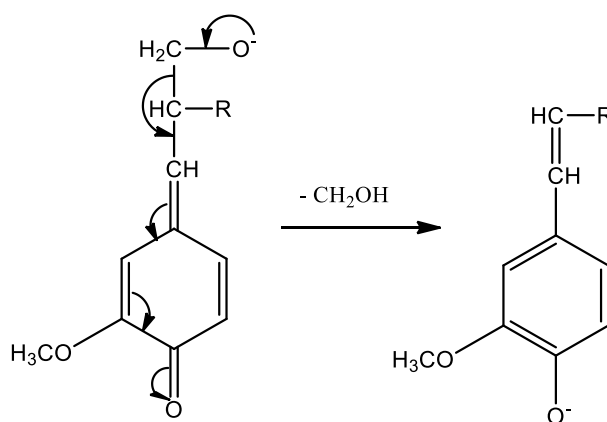


Figura A. 4 - Clivagem de uma ligação carbono-carbono, libertando formaldeído. Adaptado de [24].

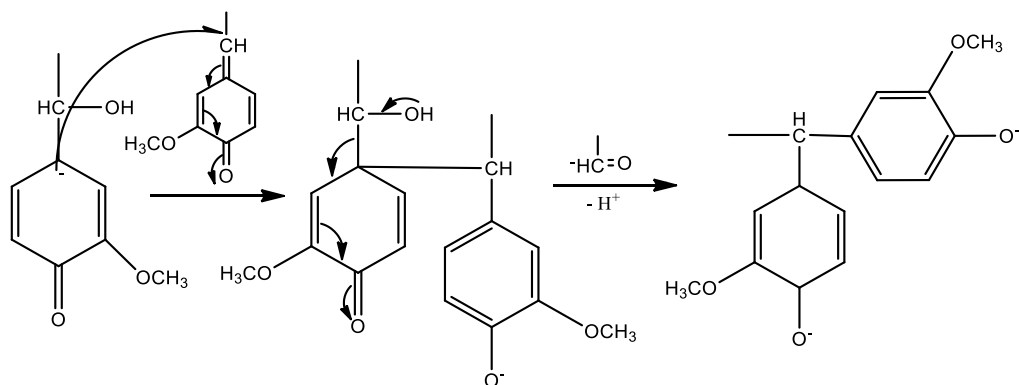


Figura A. 5 - Reação de condensação da lenhina: formação de uma ligação  $\alpha$ -1.



**A.2. Reações dos polissacarídeos no processo de cozimento kraft**

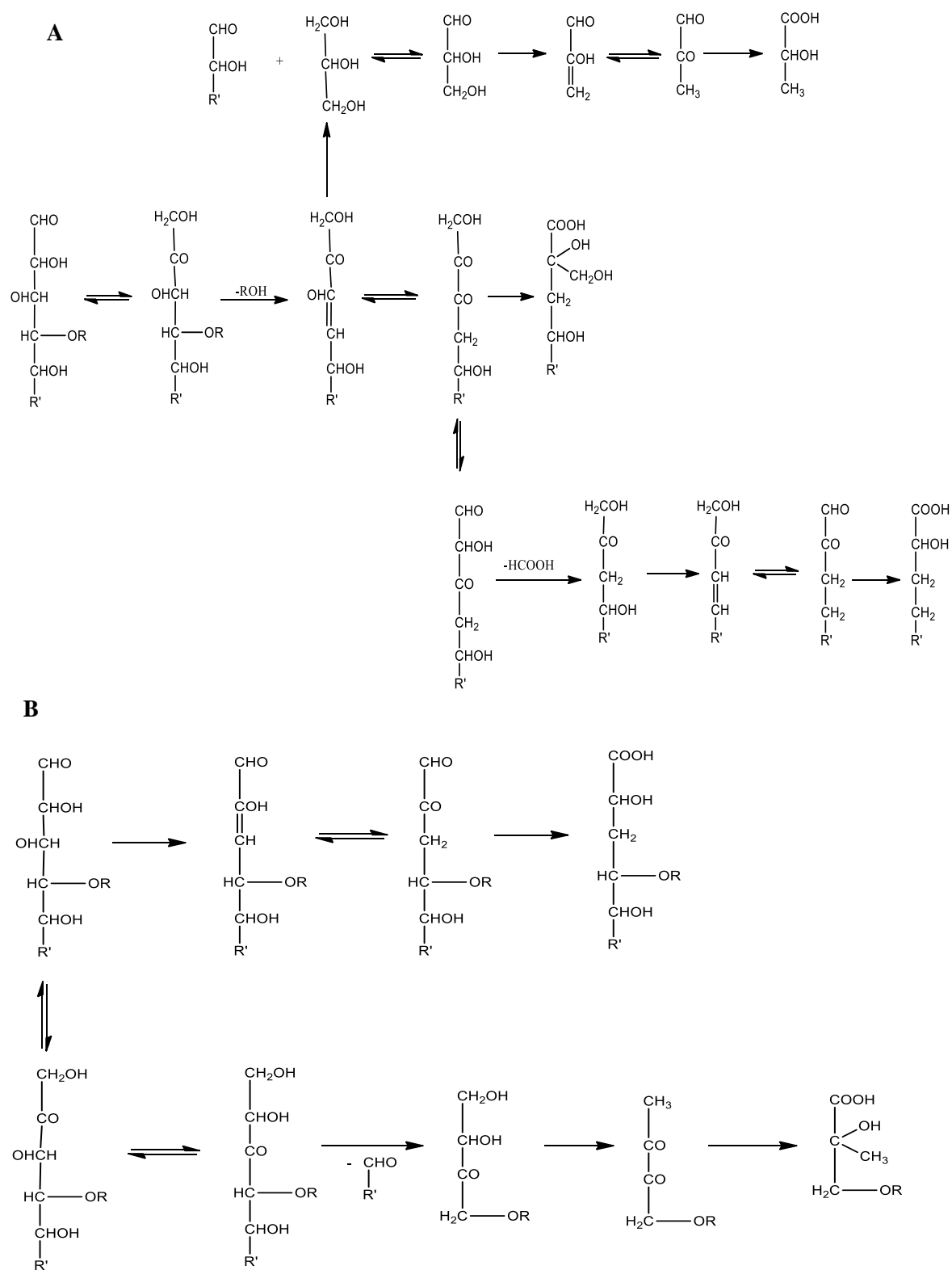


Figura A. 6 - Reação de degradação dos polissacarídeos em meio alcalino: **A**- reação de *peeling*; **B**- Reação de *stopping*. Adaptado de [24].

## B. Exemplos de cálculo

### B.1. Elaboração da curva de calibração das pentosanas

O procedimento seguido para a elaboração da curva de calibração das pentosanas encontra-se descrito na norma TAPPI T223 cm.

Começou-se por pesar porções entre 10 e 100 mg de xilose seca. A cada porção adicionaram-se 20 g de NaCl e 100 mL de HCl 3,85N e efetuou-se a destilação e o desenvolvimento de cor de acordo com o procedimento descrito em 2.1.2.5 (página 34). Em seguida, leu-se a absorvância das soluções a um comprimento de onda de 630 nm utilizando como branco 5 mL de HCl 3,85N ao qual foi aplicado o mesmo procedimento para desenvolvimento de cor.

Em seguida, a massa de xilose ( $m_{Xilose}$ ) utilizada foi convertida em massa de pentosanas ( $m_{Pentosanas}$ ) através da razão ( $R_X$ ) entre a massa molar de pentosanas ( $Mr_{Pentosanas}$ ), determinada por subtração da massa molar de uma molécula de H<sub>2</sub>O à massa molar de xilose, e a massa molar de xilose ( $Mr_{Xilose}$ ) como é indicado nas Equações B. 1 e B. 2.

$$R_X = \frac{Mr_{Pentosanas}}{Mr_{Xilose}} = \frac{132}{150} = 0,88 \quad \text{B. 1}$$

$$m_{Pentosanas} = m_{Xilose} \times 0,88 \quad \text{B. 2}$$

$R_X$  – Razão entre a massa molar de pentosanas e a massa molar de xilose;

$Mr_{Pentosanas}$  – Massa molar de pentosanas, em *g/mol*;

$Mr_{Xilose}$  – Massa molar de xilose, em *g/mol*;

$m_{Pentosanas}$  – Massa de pentosanas, em *mg*;

$m_{Xilose}$  - Massa de xilose, em *mg*.

Conhecendo a massa de pentosanas e a absorvância a 630 nm correspondente, elaborou-se a curva de calibração para o cálculo do teor de pentosanas, indicada na Figura 2.2.

### B.2. Cálculos para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática

A demonstração dos cálculos necessários a cada ensaio de hidrólise enzimática foi elaborada com base no ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca tal e qual, com alcalinidade 22%.

Os ensaios de hidrólise enzimática realizaram-se com amostras de pasta húmida. A humidade de cada pasta utilizada encontra-se na Tabela B. 1.

Tabela B. 1 - Humidade da pasta de madeira, casca tal e qual e casca extraída utilizadas na hidrólise enzimática.

	<b>% humidade</b>
Pasta de madeira	66,3
Pasta de casca tal e qual	74,0
Pasta de casca extraída com etanol/água	72,8
Pasta de casca extraída com água	70,4

Desta forma foi necessário calcular a massa de pasta húmida ( $m_{tal e qual}$ ) a pesar para garantir que se encontram 50 g de pasta absolutamente seca na suspensão, segundo a Equação B. 3.

$$\begin{aligned}
 m_{tal e qual} &= \frac{m_{pasta\ a.s.}}{1 - \frac{\%humidade}{100}} \\
 \Leftrightarrow m_{tal e qual} &= \frac{50}{1 - \frac{74,0}{100}} \\
 \Leftrightarrow m_{tal e qual} &= 192,2\ g
 \end{aligned}
 \tag{B. 3}$$

$m_{tal e qual}$  – Massa de pasta húmida, em g;

$m_{pasta\ a.s.}$  – Massa de pasta absolutamente seca, em g;

$\%humidade$  – Humidade da pasta, em % de casca.

Em seguida, calculou-se o volume da mistura comercial Cellic Ctec 2 ( $V_E$ ) a colocar num balão de 200 mL. O volume de 200 mL corresponde ao volume de solução enzimática ( $V_{SE}$ ) adicionada à suspensão para garantir que Cellic Ctec 2 se dispersa homogeneamente. Este calculo, descrito nas Equações B. 5 e B. 6, teve por base a carga enzimática escolhida para o ensaio, a sua atividade enzimática e a massa de hidratos de carbono (pentosanas e celulose) presentes na amostra de pasta, calculada segundo a Equação B. 4. O volume de Cellic Ctec 2 adicionado em cada ensaio encontra-se no Apêndice C.1.

$$\begin{aligned}
 m_{HC,pasta} &= m_{Pentosanas,pasta} + m_{Celulose,pasta} \\
 \Leftrightarrow m_{HC,pasta} &= \frac{\%Pentosanas_{pasta}}{100} \times m_{pasta\ a.s.} + \frac{\%Celulose_{pasta}}{100} \times m_{pasta\ a.s.} \\
 \Leftrightarrow m_{HC,pasta} &= \frac{18,5}{100} \times 50 + \frac{79,1}{100} \times 50 \\
 \Leftrightarrow m_{HC,pasta} &= 48,8\ g
 \end{aligned}
 \tag{B. 4}$$

$$CZ = CE \times m_{HC,pasta}$$

B. 5

$$\Leftrightarrow CZ = 25 \times 48,8 \Leftrightarrow CZ = 1219,9 \text{ FPU}$$

$$V_E = \frac{CZ}{AE} = \frac{1219,9}{114,7} = 10,6 \text{ mL}$$

B. 6

$m_{HC,pasta}$  – Massa de hidratos de carbono na pasta, em  $g$ ;

$m_{Pentosanas,pasta}$  – Massa de pentosanas na pasta, em  $g$ ;

$m_{Celulose,pasta}$  – Massa de celulose na pasta, em  $g$ ;

$\%Pentosanas_{pasta}$  - Fração de pentosanas na pasta, em % de pasta;

$\%Celulose_{pasta}$  - Fração de celulose na pasta, em % de pasta;

$CE$  – Carga enzimática, em  $FPU/g_{HC}$ ;

$CZ$  - Carga enzimática, em  $FPU$ ;

$AE$  – Atividade enzimática, em  $FPU/mL_{enzima}$ ;

$V_E$  – Volume de Cellic Ctec 2, em  $mL$ .

O volume total da suspensão é 1L, indicando-se que nos ensaios de hidrólise enzimática a fração sólida encontra-se suspensa em tampão citrato de sódio 50 mM pH=4,8. Para evitar o gasto de 1L de tampão citrato de sódio 50 mM calculou-se um volume e concentração equivalentes, adicionando-se à suspensão 100 mL de tampão citrato de sódio 0,5M pH=4,8.

Por último, o volume de água a adicionar à suspensão para perfazer o volume de 1L é calculado segundo a Equação B. 8. Esta determinação tem por base o volume da solução enzimática, o volume de tampão citrato de sódio 0,5M pH=4,8 e o volume de água presente na amostra de pasta utilizada, que é determinado pela Equação B. 7.

$$V_{\text{água,pasta}} = m_{\text{tal e qual}} - m_{\text{pasta a.s.}}$$

B. 7

$$\Leftrightarrow V_{\text{água,pasta}} = 192,2 - 50 = 142,2 \text{ g}$$

$$V_{\text{água}} = V_{\text{suspensão}} - (V_{\text{água,pasta}} + V_{SE} + V_{TC 0,5M})$$

B. 8

$$\Leftrightarrow V_{\text{água}} = 1000 - (142,2 + 200 + 100)$$

$$\Leftrightarrow V_{\text{água}} = 557,8 \text{ mL}$$

$V_{\text{água,pasta}}$  – Volume de água na pasta, em  $mL$ ;

$V_{\text{água}}$  – Volume de água a adicionar na suspensão, em  $mL$ ;

$V_{suspensão}$  – Volume total da suspensão, em  $mL$ ;

$V_{SE}$  – Volume da solução enzimática, em  $mL$ ;

$V_{TC\ 0,5M}$  – Volume de tampão Citrato de sódio 0,5M, em  $mL$ .

### B.3. Cálculo da concentração da solução de açúcares redutores

A demonstração do cálculo da concentração de açúcares redutores foi elaborada com base na amostra de hidrolisado retirada da suspensão após 24h do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca tal e qual com alcalinidade 22%, e na caracterização química da pasta (Tabela 3.5).

A concentração da solução de açúcares redutores é determinada segundo o método DNS, recorrendo aos parâmetros da equação da curva de calibração da glucose (Equação B. 9), à absorvância média de cada amostra a um comprimento de onda de 540 nm ( $Abs_{540\ nm}$ ) e ao fator de diluição de cada amostra ( $FD$ ), segundo a Equação B. 10.

$$y = 0,153x - 0,0268 \quad \text{B. 9}$$

$$C_{AR} = \frac{Abs_{540\ nm} - b}{m} \times FD \quad \text{B. 10}$$

$$\Leftrightarrow C_{AR} = \frac{0,231 - (-0,0268)}{0,153} \times 20$$

$$\Leftrightarrow C_{AR} = 33,7\ mg/mL$$

$C_{AR}$  - Concentração de açúcares redutores, em  $mg/mL$ ;

$Abs_{540\ nm}$  – Absorvância média a 540 nm;

$m$  – Declive da curva de calibração da glucose;

$b$  – Ordenada de origem da curva de calibração da glucose;

$FD$  – Fator de diluição da amostra de hidrolisado.

### B.4. Determinação da atividade enzimática de Cellic Ctec 2

O procedimento para a determinação da atividade enzimática da mistura comercial de enzimas Cellic Ctec 2 segue as normas da IUPAC [70]. O cálculo da atividade enzimática tem por base a Equação B. 11 cujo denominador é determinado através de, pelo menos, duas diluições de Cellic Ctec 2 de forma a determinar a concentração que permite a libertação de  $2 \pm 0,5$  mg de terminais redutores equivalentes a glucose. O numerador da Equação B. 11 é obtido através do fator de conversão de 2 mg de terminais redutores equivalentes a glucose em mmoles de glucose

(2,0/0,18016), do volume de Cellic Ctec 2 utilizado no ensaio (0,5 mL) e do tempo de incubação requerido para a formação dos terminais redutores equivalentes a glucose (60 minutos), segundo a Equação B. 12.

$$AE = \frac{0,37}{mL_{enzima} / mL_{solução}} \quad B. 11$$

$$\frac{2,0/0,18016}{0,5 \times 60} = 0,37 \quad B. 12$$

$AE$  – Atividade enzimática, em  $FPU/mL_{enzima}$  ;

$mL_{enzima} / mL_{solução}$  - Quociente entre o volume de Cellic Ctec 2 e o volume de solução.

Pelo método DNS e com o auxílio da curva de calibração da glucose (Figura 2.5) determinou-se a concentração de glucose libertada por cada diluição de Cellic Ctec 2, segundo o exemplo de cálculo descrito no Apêndice B.2. Em seguida, determinou-se a massa de glucose correspondente através da Equação B. 13, na qual o volume final de solução em cada tudo de ensaio é 24,5 mL.

$$m_{Glucose} = C_{Glucose} \times V_{solução} \quad B. 13$$

$m_{Glucose}$  – Massa de glucose, em  $mg$ ;

$C_{Glucose}$  – Concentração de glucose, em  $mg/mL$ ;

$V_{solução}$  – Volume final de solução, em  $mL$ .

Em seguida, elaborou-se a representação gráfica da massa de glucose em função do quociente entre o volume de Cellic Ctec 2 e o volume de solução ( $mL_{enzima}/mL_{solução}$ ), representada na Figura B. 1.

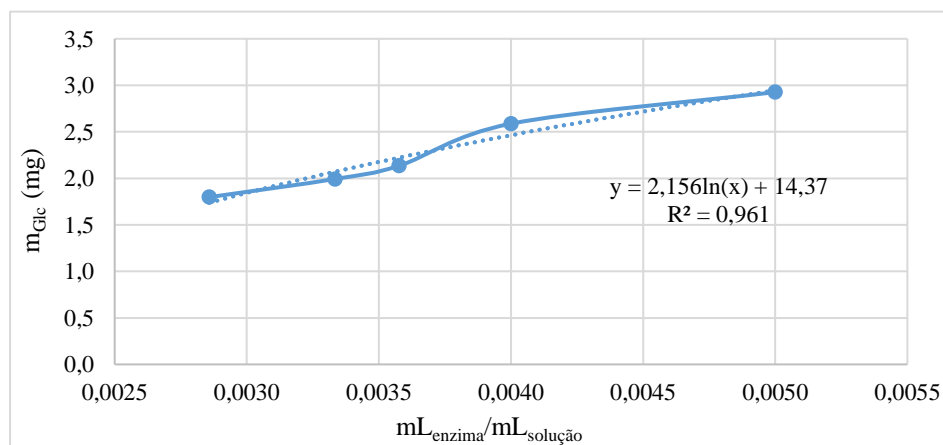


Figura B. 1 – Representação gráfica da massa de glucose ( $m_{Glc}$ ) em função do quociente entre o volume de Cellic Ctec 2 e o volume de solução ( $mL_{enzima}/mL_{solução}$ ).

Com os parâmetros desta equação, declive ( $m$ ) e ordenada na origem ( $b$ ), determinou-se a diluição de Cellic Ctec 2, cuja concentração permite a libertação de cerca de 2 mg de terminais redutores equivalentes a glucose. Em seguida determinou-se a atividade enzimática da mistura comercial de enzimas, segundo as Equações B. 14 e B. 15, respetivamente.

$$mL_{enzima} / mL_{solução} = e^{\frac{m_{Glc}-b}{m}} = e^{\frac{2-14,37}{2,156}} = 3,226 \times 10^{-3} \quad \text{B. 14}$$

$$AE = \frac{0,37}{3,226 \times 10^{-3}} = 114,7 \text{ FPU} / mL_{enzima} \quad \text{B. 15}$$

### B.5. Cálculo da conversão de açúcares redutores

A demonstração do cálculo da conversão de açúcares redutores foi elaborada com base na amostra de hidrolisado retirada da suspensão após 24h do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca tal e qual com alcalinidade 22%, e na caracterização química da pasta (Tabela 3.5).

O cálculo da conversão de açúcares redutores é realizado através da comparação da massa de açúcares redutores libertada ao longo dos ensaios de hidrólise e a massa teórica de açúcares na pasta (glucose e xilose).

No final das 24h de cada ensaio o hidrolisado foi filtrado a vácuo para remover sólidos remanescentes em suspensão. Desta forma quantificou-se o volume final de hidrolisado de cada ensaio ( $V_{hidrolisado}$ ), cujos resultados se encontram no Apêndice C.1.

A concentração de açúcares redutores em cada amostra ( $C_{AR}$ ) é determinada pelo método DNS, segundo o exemplo de cálculo indicado no Apêndice B.3. Através da concentração de açúcares e do volume de hidrolisado recolhido no final do ensaio de hidrólise ( $V_{hidrolisado}$ ) determinou-se a massa de açúcares redutores em cada amostra ( $m_{AR}$ ), segundo a Equação B. 16.

$$m_{AR} = C_{AR} \times V_{hidrolisado} \times 10^{-3} = 33,72 \times 820 \times 10^{-3} = 27,7 \text{ g} \quad \text{B. 16}$$

$C_{AR}$  – Concentração de açúcares redutores, em  $mg/mL$ ;

$m_{AR}$  – Massa de açúcares redutores, em  $g$ ;

$V_{hidrolisado}$  – Volume de hidrolisado final, em  $mL$ .

A massa teórica de açúcares redutores ( $m_{AR\_teórica}$ ) é a soma da massa de glucose e da massa de xilose estimadas para a massa de pasta utilizada no ensaio. Para este efeito calcula-se a razão entre a massa molar de celulose e massa molar de glucose,  $R_G$ , como é indicado na Equação B. 17. A

massa molar da celulose ( $Mr_{Celulose}$ ) é determinada através da subtração da massa molar de uma molécula de  $H_2O$  removida na formação de uma ligação glicosídica entre duas unidades de glucose, à massa molar da glucose ( $Mr_{Glucose}$ ) que é 180 g/mol, obtendo-se o valor de 162 g/mol para a massa molar da celulose.

$$R_G = \frac{Mr_{Celulose}}{Mr_{Glucose}} = \frac{162}{180} = 0,90 \quad \text{B. 17}$$

$R_G$  – Razão entre a massa molar de celulose e a massa molar de glucose;

$Mr_{Celulose}$  – Massa molar de celulose, em g/mol;

$Mr_{Glucose}$  – Massa molar de glucose, em g/mol.

Uma vez que o teor de celulose na pasta ( $\%Celulose_{pasta}$ ) é conhecido, determina-se a massa de celulose na pasta ( $m_{Celulose,pasta}$ ) através da Equação B. 18 e, aplicando o resultado à razão  $R_G$  estima-se a massa de glucose na pasta ( $m_{Glucose,pasta}$ ) como é indicado na Equação B. 19.

$$m_{Celulose,pasta} = \frac{\%Celulose_{pasta}}{100} \times m_{pasta \text{ a.s.}} = \frac{79,09}{100} \times 50 = 39,6 \text{ g} \quad \text{B. 18}$$

$$m_{Glucose,pasta} = \frac{m_{Celulose,pasta}}{R_G} = \frac{39,6}{0,90} = 43,9 \text{ g} \quad \text{B. 19}$$

$m_{Celulose,pasta}$  – Massa de celulose na pasta, em g;

$\%Celulose_{pasta}$  – Teor de celulose na pasta, em % de pasta;

$m_{pasta \text{ a.s.}}$  – Massa de pasta absolutamente seca, em g;

$m_{Glucose,pasta}$  – Massa de glucose na pasta, em g.

Para calcular a massa de xilose na pasta segue-se um procedimento semelhante ao anterior, determinando-se a razão ( $R_X$ ) entre a massa molar de pentosanas, determinada por subtração da massa molar de uma molécula de  $H_2O$  à massa molar de xilose, e a massa molar de xilose (Equação B. 20).

$$R_X = \frac{Mr_{Pentosanas}}{Mr_{Xilose}} = \frac{132}{150} = 0,88 \quad \text{B. 20}$$

$R_X$  – Razão entre a massa molar de pentosanas e a massa molar de xilose;

$Mr_{Pentosanas}$  – Massa molar de pentosanas, em g/mol;



$M_{r_{xilose}}$  – Massa molar de xilose, em  $g/mol$ .

Posteriormente, calcula-se a massa de pentosanas na amostra de pasta ( $m_{Pentosanas,pasta}$ ) e aplica-se esse valor à razão  $R_X$  determinando-se a massa de xilose na pasta ( $m_{Xilose,pasta}$ ), segundo as Equações B. 21 e B. 22, respetivamente.

$$m_{Pentosanas} = \frac{\%Pentosanas_{pasta}}{100} \times m_{pasta\ a.s.} = \frac{18,50}{100} \times 50 = 9,25\ g \quad B. 21$$

$$m_{Xilose} = \frac{m_{Pentosanas}}{R_X} = \frac{9,25}{0,88} = 10,5\ g \quad B. 22$$

$m_{Pentosanas,pasta}$  – Massa de pentosanas na pasta, em  $g$ ;

$\%Pentosanas_{pasta}$  – Teor de pentosanas na pasta, em % de pasta;

$m_{pasta\ a.s.}$  – Massa de pasta absolutamente seca, em  $g$ ;

$m_{Xilose,pasta}$  – Massa de xilose na pasta, em  $g$ .

Seguidamente, determina-se a massa teórica de açúcares redutores na pasta ( $m_{AR,teórica}$ ) através da Equação B. 23 e consequentemente a conversão em açúcares redutores ( $x$ ), pela Equação B. 24.

$$m_{AR,teórica} = m_{Glucose,pasta} + m_{Xilose,pasta} = 43,9 + 10,5 = 54,4\ g \quad B. 23$$

$$x = \frac{m_{AR}}{m_{AR,teórica}} \times 100 = \frac{27,7}{54,4} \times 100 = 50,8\% \quad B. 24$$

$m_{AR,teórica}$  – Massa teórica de açúcares redutores na pasta, em  $g$ ;

$m_{Glucose,pasta}$  – Massa de glucose na pasta, em  $g$ ;

$m_{Xilose,pasta}$  – Massa de xilose na pasta, em  $g$ ;

$x$  – Conversão em açúcares redutores, em %;

$m_{AR}$  – Massa de açúcares redutores produzidos, em  $g$ .

## B.6. Cálculo das frações removidas na pré-extração e no cozimento kraft

### B.6.1. Cálculo da fração removida na pré-extração da casca de *E. globulus*

A demonstração do cálculo da fração removida na pré-extração da casca foi realizada com base na fração de pentosanas na abordagem da pré-extração com etanol/água.

No âmbito do estudo do impacto da pré-extração na composição química da casca de *E. globulus*, calculou-se a fração removida de cada componente da casca durante a pré-extração ( $\%R_P$ ), através da Equação B. 26. Para isso, a composição das amostras de casca extraída foi recalculada para a base de massa inicial da casca, segundo a Equação B. 25 na qual  $P$  representa um componente genérico da composição química da casca.

$$P = \frac{P_{ext} \times (100 - \eta_{ext})}{100}$$

$$\Leftrightarrow P = \frac{19,34 \times (100 - 14,45)}{100} \Leftrightarrow P = 16,5\% \quad \text{B. 25}$$

$$\%R_P = \frac{P_0 - P}{P_0} \times 100$$

$$\Leftrightarrow \%R_P = \frac{18,9 - 16,5}{18,9} \times 100 \Leftrightarrow \%R_P = 12,4\% \quad \text{B. 26}$$

$P_{ext}$  – Fração de pentosanas após a extração, em % de casca extraída;

$\eta_{ext}$  – Rendimento da extração, em % de casca inicial.

$P$  – Fração de pentosanas após extração, em % de casca inicial;

$\%R_P$  – Fração removida de pentosanas durante a extração, em % de casca inicial;

$P_0$  – Fração de pentosanas na casca inicial, em % de casca inicial.

Na Figura B. 2 encontram-se ilustradas as frações de extratáveis em etanol/tolueno, lenhina total, pentosanas e celulose da casca tal e qual removidas durante a extração com etanol/água e a extração com água.

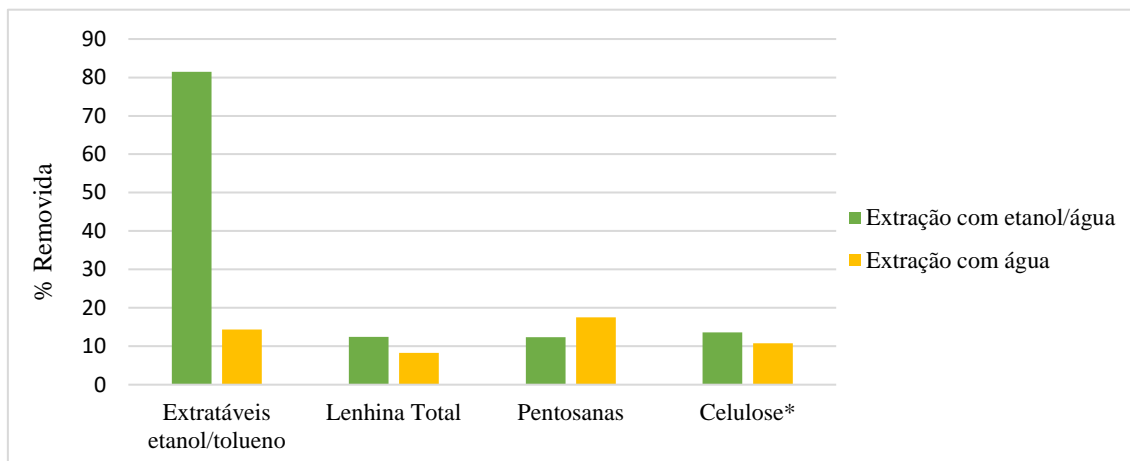


Figura B. 2 - Fração de extratáveis em etanol/tolueno, lenhina total, pentosanas e celulose\* removida na extração da casca com etanol/água e na extração com água, face à casca tal e qual.

### B.6.2. Cálculo da fração removida no cozimento de casca tal e qual e de casca extraída

Com o objetivo de analisar o impacto da pré-extração no cozimento kraft, a composição das pastas de casca extraída foi recalculada para a base de casca extraída, a partir de Equação B. 27, e em seguida determinou-se a fração removida de cada componente no cozimento, pela Equação B. 28. Relativamente à composição das pastas de casca tal e qual, esta foi também recalculada para a base de casca inicial.

A demonstração deste cálculo foi realizada com base na fração de pentosanas no cozimento kraft da casca extraída com etanol/água.

$$P_{ext} = \frac{P_{pasta} \times \eta_{dep}}{100}$$

$$\Leftrightarrow P_{ext} = \frac{14,6 \times 49,7}{100} \quad \text{B. 27}$$

$$\Leftrightarrow P_{ext} = 7,26 \%$$

$$\%R_P = \left( \frac{P_0 - P_{ext}}{P_0} \right) \times 100$$

$$\Leftrightarrow \%R_P = \left( \frac{19,3 - 7,20}{19,3} \right) \times 100 \quad \text{B. 28}$$

$$\Leftrightarrow \%R_P = 62,5 \%$$

$P_{pasta}$  – Fração de pentosanas na pasta de casca extraída, em % de pasta;

$P_{ext}$  – Fração de pentosanas na pasta de casca extraída, em % de casca extraída;

$\eta_{dep}$  – Rendimento da depurado, em % de casca extraída.

$\%R_P$  – Fração removida de pentosanas durante o cozimento, em % de casca extraída;

$P_0$  – Fração de pentosanas na casca extraída, em % de casca extraída.

A frações de extratáveis, lenhina, pentosanas e celulose perdidas durante o cozimento da casca extraída com etanol/água, da casca extraída com água e da casca tal e qual, encontram-se no gráfico da Figura B. 3.

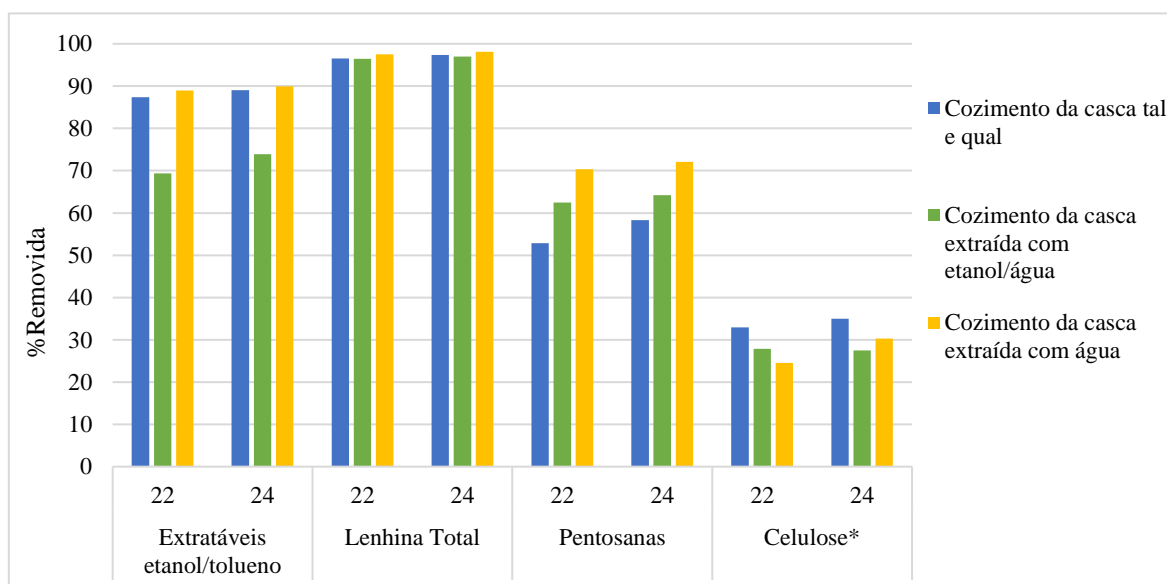


Figura B. 3 - Fração de extratáveis em etanol/tolueno, lenhina total, pentosanas e celulose\* removidas no cozimento kraft de casca extraída e de casca tal e qual.

### B.7. Cálculos do balanço de massa global

No balanço de massa global das sequências de valorização da casca de *E. globulus* estudadas neste trabalho, pretende-se determinar a massa de açúcares redutores e a massa de compostos fenólicos totais produzidos admitindo que são alimentadas ao processo 100 000 ton de casca anualmente. O balanço global tem por base o digrama genérico de processo da Figura B. 4.

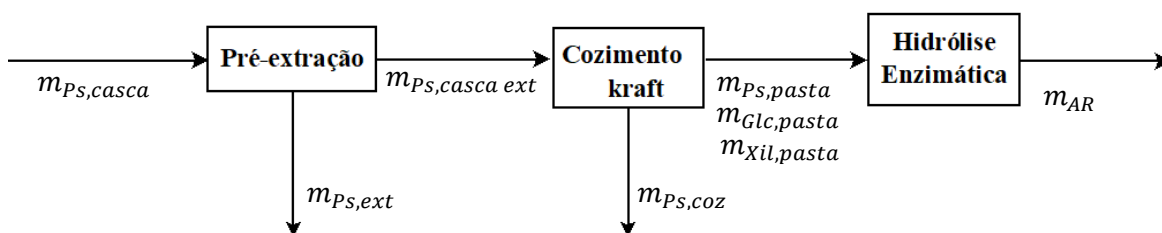


Figura B. 4- Diagrama genérico para o balanço de massa a cada sequência de valorização.

A demonstração do cálculo do balanço de massa foi realizada com base na sequência de valorização que integra a pré-extração com etanol/água e o cozimento kraft, com fator H 1114 e alcalinidade de 22%.

Primeiramente, determinou-se a massa de polissacarídeos na casca alimentada à sequência de processos através da Equação B. 29.

$$m_{Ps,casca} = m_{casca} \times \frac{\%Ps, casca}{100}$$

$$\Leftrightarrow m_{Ps,casca} = 100000 \times \frac{75,4}{100} \Leftrightarrow m_{Ps,casca} = 75440 \text{ ton/ano}$$
B. 29

$m_{Ps,casca}$  – Massa de polissacarídeos na casca inicial, em ton/ano;

$m_{casca}$  – Massa de casca tal e qual alimentada ao processo, em ton/ano;

$\%Ps, casca$  – Teor de polissacarídeos na casca inicial, em % de casca inicial;

Em seguida, realizou-se o balanço à massa de polissacarídeos na pré-extração da casca para determinar a massa de polissacarídeos presente na casca extraída (Equação B. 30).

$$m_{Ps,casca} = m_{Ps,ext} + m_{Ps,casca \text{ ext}}$$

$$\Leftrightarrow m_{Ps,casca} = \left( m_{Ps,casca} \times \frac{\%R_{Ps,ext}}{100} \right) + m_{Ps,casca \text{ ext}}$$

$$\Leftrightarrow m_{Ps,casca \text{ ext}} = m_{Ps,casca} \times \left( 1 - \frac{\%R_{Ps,ext}}{100} \right)$$

$$\Leftrightarrow m_{Ps,casca \text{ ext}} = 75440 \times \left( 1 - \frac{13,3}{100} \right)$$

$$\Leftrightarrow m_{Ps,casca \text{ ext}} = 65406 \text{ ton/ano}$$
B. 30

$m_{Ps,ext}$  – Massa de polissacarídeos removidos na pré-extração, em ton/ano;

$m_{Ps,casca \text{ ext}}$  – Massa de polissacarídeos na casca extraída, em ton/ano;

$\%R_{Ps,ext}$  – Fração de polissacarídeos removidos na pré-extração, em % de casca inicial.

A metodologia descrita acima foi aplicada no balanço à massa de polissacarídeos no cozimento kraft com o intuito de determinar a massa de polissacarídeos na pasta resultante (Equação B. 31).

$$\begin{aligned}
m_{PS,casca\ ext} &= m_{PS,coz} + m_{PS,pasta} \\
\Leftrightarrow m_{PS,casca\ ext} &= (m_{PS,casca\ ext} \times \%R_{PS,coz}) + m_{PS,pasta} \\
\Leftrightarrow m_{PS,pasta} &= m_{PS,casca\ ext} \times \left(1 - \frac{\%R_{PS,coz}}{100}\right) \\
\Leftrightarrow m_{PS,pasta} &= 65406 \times \left(1 - \frac{36,6}{100}\right) \\
\Leftrightarrow m_{PS,pasta} &= 41468\ ton/ano
\end{aligned}
\tag{B. 31}$$

$m_{PS,coz}$  – Massa de polissacarídeos removidos no cozimento kraft, em ton/ano;

$m_{PS,pasta}$  – Massa de polissacarídeos na pasta, em ton/ano;

$\%R_{PS,coz}$  – Fração de polissacarídeos removidos no cozimento kraft, em % de casca extraída.

Conhecendo a massa de polissacarídeos na pasta resultante do cozimento kraft de casca previamente extraída, determinou-se a massa de pentosanas e de celulose na pasta, segundo a Equação B. 32 e a Equação B. 33, respetivamente.

$$\begin{aligned}
m_{Pentosanas,pasta} &= \frac{\%Pentosanas_{pasta}}{\%PS_{pasta}} \times m_{PS,pasta} \\
\Leftrightarrow m_{Pentosanas,pasta} &= 0,15 \times 41468 \\
\Leftrightarrow m_{Pentosanas,pasta} &= 6194\ ton/ano
\end{aligned}
\tag{B. 32}$$

$$\begin{aligned}
m_{Celulose,pasta} &= \frac{\%Celulose_{pasta}}{\%PS_{pasta}} \times m_{PS,pasta} \\
\Leftrightarrow m_{Celulose,pasta} &= 0,85 \times 41468 \\
\Leftrightarrow m_{Celulose,pasta} &= 35273\ ton/ano
\end{aligned}
\tag{B. 33}$$

Aplicando a razão entre a massa molar de pentosanas e a massa molar de xilose ( $R_X$ ) à massa de pentosanas na pasta, determinou-se a massa de xilose disponível na pasta segundo a Equação B. 34.

$$\begin{aligned}
m_{Xil,pasta} &= \frac{m_{Pentosanas,pasta}}{R_X} \\
\Leftrightarrow m_{Xil,pasta} &= \frac{6194}{0,88} \Leftrightarrow m_{Xil,pasta} = 7039\ ton/ano
\end{aligned}
\tag{B. 34}$$

$m_{xil,pasta}$  – Massa de xilose disponível na pasta, em ton/ano;

$m_{pentosanas,pasta}$  – Massa de pentosanas na pasta, em ton/ano;

$R_X$  – Razão entre a massa molar de pentosanas e massa molar de xilose.

Da mesma forma, aplicando a razão entre a massa molar de celulose e a massa molar de glucose ( $R_G$ ) à massa de celulose na pasta, determinou-se a massa de glucose disponível na pasta segundo a Equação B. 35.

$$m_{Glc,pasta} = \frac{m_{Celulose,pasta}}{R_G}$$

$$\Leftrightarrow m_{Glc,pasta} = \frac{35273}{0,90} \quad \text{B. 35}$$

$$\Leftrightarrow m_{Glc,pasta} = 39193 \text{ ton/ano}$$

$m_{Glc,pasta}$  – Massa de glucose disponível na pasta, em ton/ano;

$m_{Celulose,pasta}$  – Massa de celulose na pasta, em ton/ano;

$R_G$  – Razão entre a massa molar de celulose e massa molar de glucose.

A soma da massa de xilose e da massa de glucose na pasta, permite determinar a massa de açúcares disponíveis na pasta para a hidrólise enzimática (Equação B. 36). Desta forma, conhecendo a massa de açúcares na pasta e a conversão de polissacarídeos em açúcares redutores por hidrólise enzimática, determinou-se a massa de açúcares redutores produzidos em cada sequência de valorização, segundo a Equação B. 37.

$$m_{AR,pasta} = m_{xil,pasta} + m_{Glc,pasta}$$

$$\Leftrightarrow m_{AR,pasta} = 7039 + 39193 \quad \text{B. 36}$$

$$\Leftrightarrow m_{AR,pasta} = 46232 \text{ ton/ano}$$

$$m_{AR} = m_{AR,pasta} \times \left(\frac{x}{100}\right)$$

$$\Leftrightarrow m_{AR} = 46232 \times \left(\frac{71,7}{100}\right) \quad \text{B. 37}$$

$$\Leftrightarrow m_{AR} = 33148 \text{ ton/ano}$$

$m_{AR,pasta}$  – Massa de açúcares redutores disponíveis na pasta, em ton/ano;

$m_{AR}$  – Massa de açúcares redutores produzidos, em ton/ano;

$x$  – Conversão de polissacarídeos em açúcares redutores;

## C. Tabelas e Figuras Auxiliares

### C.1. Resultados da hidrólise enzimática

#### C.1.1. Volume de Cellic Ctec 2 e volume final de hidrolisado

Tabela C. 1 – Volume de Cellic Ctec 2 utilizado em cada ensaio e volume final de hidrolisado obtido em cada ensaio.

Ensaio de hidrólise enzimática	$V_E$ (mL)	$V_{hidrolisado}$ (mL)
Pasta de madeira	10,7	850
Pasta de casca tal e qual	10,6	820
Pasta de casca extraída com etanol/água	10,7	820
Pasta de casca extraída com água	10,7	800

#### C.1.2. Conversão, concentração e massa de açúcares redutores

Tabela C. 2 – Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de madeira.

t (h)	$Abs_{540\text{ nm}}$	FD	$C_{AR}$ (mg/mL)	$m_{AR}$ (g)	$x$ (%)
0,0	0,0710	5	3,20	2,72	4,97
0,5	0,523	5	18,0	15,3	27,9
1,0	0,344	5	24,2	20,6	37,6
1,5	0,397	10	27,7	23,5	43,0
2,0	0,449	10	31,1	26,5	48,4
2,5	0,494	10	34,1	29,0	52,9
3,0	0,523	10	35,9	30,5	55,8
4,0	0,286	10	40,9	34,8	63,6
5,0	0,325	20	46,0	39,1	71,4
6,0	0,350	20	49,3	41,9	76,6
7,0	0,389	20	54,4	46,2	84,5
8,0	0,378	20	52,9	45,0	82,3
8,5	0,380	20	53,1	45,2	82,6
23,0	0,467	20	64,5	54,8	100,3
24,0	0,476	20	65,8	55,9	102,2



Tabela C. 3 - Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca tal e qual.

<b>t (h)</b>	<b>Abs<sub>540 nm</sub></b>	<b>FD</b>	<b>C<sub>AR</sub> (mg/mL)</b>	<b>m<sub>AR</sub> (g)</b>	<b>x (%)</b>
0,0	0,216	5	7,92	6,50	11,9
0,5	0,284	5	10,1	8,32	15,3
1,0	0,200	10	14,8	12,2	22,3
1,5	0,230	10	16,8	13,8	25,3
2,0	0,250	10	18,1	14,8	27,2
2,5	0,259	10	18,7	15,3	28,1
3,0	0,278	10	19,9	16,3	30,0
3,5	0,161	20	24,6	20,1	37,0
4,5	0,177	20	26,7	21,9	40,1
5,0	0,186	20	27,8	22,8	41,9
6,0	0,194	20	28,9	23,7	43,5
7,0	0,198	20	29,3	24,1	44,2
8,0	0,206	20	30,5	25,0	45,9
23,0	0,226	20	33,1	27,1	49,8
24,0	0,231	20	33,7	27,7	50,8

Tabela C. 4 - Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca extraída com etanol/água.

<b>t (h)</b>	<b>Abs<sub>540 nm</sub></b>	<b>FD</b>	<b>C<sub>AR</sub> (mg/mL)</b>	<b>m<sub>AR</sub> (g)</b>	<b>x (%)</b>
0,0	0,163	5	6,19	5,08	9,31
0,5	0,469	5	16,2	13,3	24,4
1,0	0,264	10	19,0	15,6	28,6
1,5	0,393	10	27,4	22,5	41,3
2,0	0,454	10	31,4	25,8	47,3
2,5	0,507	10	34,9	28,6	52,5
3,0	0,513	10	35,3	28,9	53,1
3,5	0,260	20	37,4	30,7	56,3
4,5	0,278	20	39,9	32,7	60,0
5,0	0,281	20	40,2	33,0	60,5
6,0	0,286	20	40,9	33,5	61,4
7,0	0,290	20	41,4	34,0	62,3
8,0	0,294	20	41,9	34,4	63,0
23,0	0,335	20	47,3	38,8	71,1
24,0	0,338	20	47,7	39,1	71,7

Tabela C. 5 - Resultados do ensaio de hidrólise enzimática da pasta de casca extraída com água.

<b>t (h)</b>	<b>Abs<sub>540 nm</sub></b>	<b>FD</b>	<b>C<sub>AR</sub> (mg/mL)</b>	<b>m<sub>AR</sub> (g)</b>	<b>x (%)</b>
0,0	0,0950	5	3,98	3,19	5,85
0,5	0,318	5	11,3	9,0	16,5
1,0	0,222	10	16,2	13,0	23,8
2,0	0,272	10	19,6	15,7	28,7
2,3	0,296	10	21,1	16,9	31,0
2,5	0,346	10	24,4	19,5	35,8
3,0	0,358	10	25,1	20,1	36,9
3,5	0,178	20	26,7	21,4	39,2
4,0	0,185	20	27,6	22,1	40,6
4,5	0,188	20	28,0	22,4	41,1
6,0	0,200	20	29,7	23,7	43,5
7,0	0,211	20	31,0	24,8	45,6
21,0	0,295	20	42,1	33,7	61,8
22,0	0,295	20	42,1	33,7	61,8
23,0	0,296	20	42,2	33,8	62,0
24,0	0,298	20	42,4	33,9	62,3

## C.2. Resultados do cálculo da fração removida na pré-extração e no cozimento kraft

Tabela C. 6 – Composição química da casca extraída com etanol/água e da casca extraída com água recalculada para a base de massa inicial de casca.

	<b>Casca extraída com etanol/água</b>	<b>Casca extraída com água</b>
	<b>% m/m<sub>casca a.s.</sub></b>	<b>% m/m<sub>casca a.s.</sub></b>
Cinzas	1,75	1,57
Extratáveis em etanol/tolueno	0,321	1,49
Lenhina Klason	16,8	17,5
Lenhina solúvel	1,27	1,40
Lenhina total	18,1	18,9
Pentosanas	16,5	15,6
Celulose*	48,9	50,5
Polissacarídeos**	65,4	66,1

\*A fração de celulose nas amostras de *E. globulus* foi calculada por diferença entre 100% e o somatório da fração dos componentes determinados experimentalmente.

\*\*Soma do teor de pentosanas e do teor de celulose em cada amostra.

Tabela C. 7 – Fração removida de cada componente da casca (%R<sub>P</sub>) na pré-extração com etanol/água e na pré-extração com água.

	<b>Casca extraída com etanol/água</b>	<b>Casca extraída com água</b>
	<b>%R<sub>P</sub> (% m/m<sub>casca a.s.</sub>)</b>	<b>%R<sub>P</sub> (% m/m<sub>casca a.s.</sub>)</b>
Cinzas	19,9	28,1
Extratáveis em etanol/tolueno	81,5	14,3
Lenhina Klason	11,7	7,8
Lenhina solúvel	21,8	14,1
Lenhina total	12,5	8,3
Pentosanas	12,4	17,5
Celulose*	13,6	10,7
Polissacarídeos**	13,3	12,4

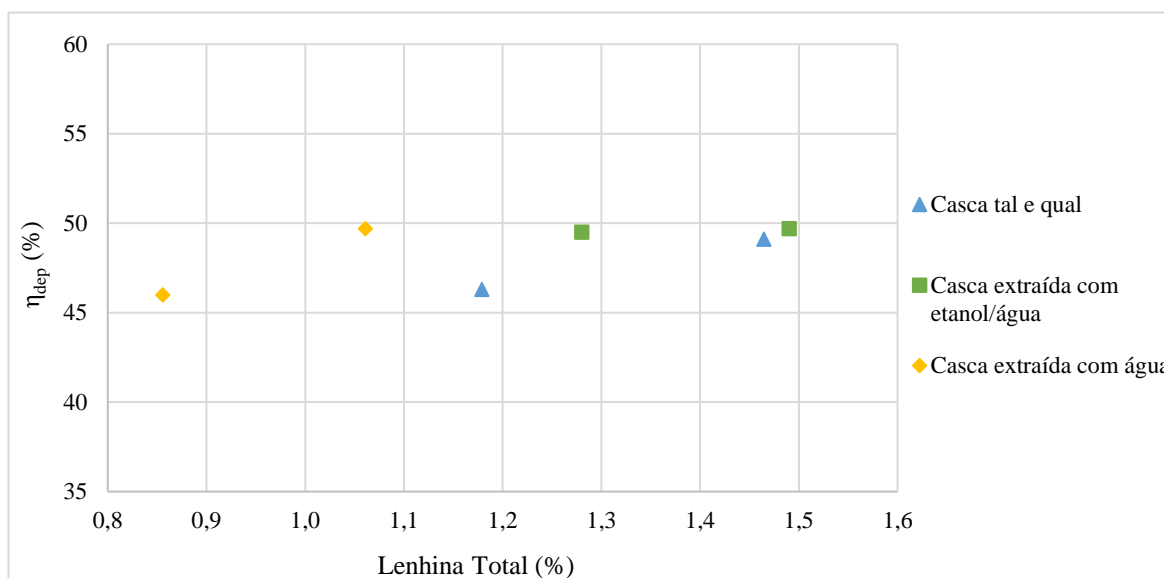
Tabela C. 8 - Composição química da pasta de casca tal e qual recalculada para base de massa inicial de casca, e da pasta de casca extraída com etanol/água e com água recalculada para a base de massa de casca extraída.

AA (%)	<b>Pasta de casca tal e qual</b>		<b>Pasta de casca extraída com etanol/água</b>		<b>Pasta de casca extraída com água</b>	
	<b>(% m/m<sub>casca a.s.</sub>)</b>		<b>(% m/m<sub>casca_ext a.s.</sub>)</b>		<b>(% m/m<sub>casca_ext a.s.</sub>)</b>	
	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>24</b>
Cinzas	0,255	0,301	0,268	0,297	0,363	0,400
Extratáveis em etanol/tolueno	0,219	0,190	0,115	0,0978	0,186	0,170
Lenhina Klason	0,440	0,282	0,427	0,297	0,333	0,214
Lenhina solúvel	0,265	0,264	0,313	0,337	0,194	0,179
Lenhina total	0,704	0,546	0,741	0,634	0,527	0,394
Pentosanas	8,90	8,06	7,26	6,93	5,24	4,95
Celulose*	38,0	37,2	41,3	41,5	43,4	40,1
Polissacarídeos**	46,9	45,3	48,6	48,5	48,6	45,0

Tabela C. 9 - Fração removida (%R<sub>P</sub>) de cada componente da casca extraída com etanol/água, da casca extraída com água e da casca tal e qual no cozimento kraft.

AA (%)	Pasta de casca tal e qual		Pasta de casca extraída com etanol/água		Pasta de casca extraída com água	
	%R <sub>P</sub> (% m/m <sub>casca a.s.</sub> )		%R <sub>P</sub> (% m/m <sub>casca_ext a.s.</sub> )		%R <sub>P</sub> (% m/m <sub>casca_ext a.s.</sub> )	
	22	24	22	24	22	24
Cinzas	88,3	86,2	86,8	85,4	79,6	77,5
Extratáveis em etanol/tolueno	87,4	89,0	69,3	73,9	89,0	90,0
Lenhina Klason	97,7	95,4	97,8	98,5	98,3	98,9
Lenhina solúvel	82,0	80,1	76,4	74,6	86,5	87,5
Lenhina total	96,6	97,4	96,5	97,0	97,5	98,2
Pentosanas	52,9	58,3	62,5	64,2	70,4	72,0
Celulose*	33,0	35,0	27,9	27,5	24,6	30,3
Polissacarídeos**	37,9	40,9	36,6	36,7	35,3	40,1

### C.3. Representação gráfica do rendimento depurado em função do teor de lenhina total nas pastas

Figura C. 1 – Representação gráfica do rendimento depurado ( $\eta_{dep}$ ) em função do teor de lenhina total nas pastas de casca tal e qual, pastas de casca extraída com etanol/água e pastas de casca extraída com água.