



**Eva da Cunha
Cabral**

**Estudo da hidrólise da pasta kraft com diferentes
enzimas.**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Engenheiro Alexandre Miguel Ricardo Gaspar do Instituto de Investigação da Floresta e Papel - RAIZ.

Dedico este trabalho à minha irmã e aos meus pais.

O júri

Presidente

Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco
Professora Auxiliar do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutora Ana Paula Moura Tavares
Investigadora Auxiliar do LSRE – Laboratório de Separação e Engenharia da Reação/Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Engenheiro Alexandre Miguel Ricardo Gaspar
Instituto de Investigação da Floresta e do Papel -RAIZ

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, e ao Engenheiro Alexandre Miguel Ricardo Gaspar do Instituto de Investigação da Floresta e Papel - RAIZ pela oportunidade que me deram em desenvolver este trabalho e pelo apoio dado durante a sua elaboração.

Ao Instituto de Investigação da Floresta e do Papel – RAIZ, pela disponibilização dos laboratórios para realização das hidrólises enzimáticas, pelo fornecimento das pastas e reagentes e pela forma como fui bem recebida. Um grande agradecimento em especial para a Patrícia Figueiredo por toda a ajuda e amizade. A todos os restantes colegas e amigos que encontrei no RAIZ um sentido obrigada por todas as conversas e apoio dado.

À Professora Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco pela ajuda prestada com a estimativa de parâmetros através do software Matlab. Quero agradecer também ao colega e amigo Rúben dos Santos por toda a ajuda dada neste trabalho.

Aos meus pais e irmã pelo incansável apoio, carinho e admiração que demonstraram durante toda a minha vida.

À minha amiga, Ana Quaresma, por todos os momentos que passamos juntas durante estes 5 anos de curso, por todas as gargalhadas, lágrimas, conversas e até silêncio que partilhamos.

Aos meus grandes amigos onde encontro conforto e coragem sempre que me faltava. Ao desporto que nos une e que nos torna as pessoas que somos hoje.

Ao resto da minha família que sempre me apoiou durante todos os momentos.

Palavras-chave

Pasta de Papel, Celulose, Hemicelulose, Celulases, Hidrólise Enzimática, Açúcares Redutores, Glucose, Xilose.

Resumo

A hidrólise de pastas da indústria papelreira está a ser investigada a nível internacional para a conversão dos polissacáridos existentes na pasta de papel a monossacáridos, suscetíveis a fermentação para a produção de biocombustíveis de segunda geração ou outros bioprodutos de elevado valor acrescentado.

O objetivo deste trabalho foi estudar a hidrólise enzimática das pastas kraft cruas e branqueadas, do RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e do Papel. Nestas hidrólises estudou-se o efeito da concentração de enzima, assim como o efeito da concentração de substrato. As hidrólises de pastas cruas foram realizadas recorrendo a cinco preparados enzimáticos comerciais diferentes, sendo estes a Cellic Ctec 2, Optimase, Serzym 42, Celluclast 1,5L e Novozyme NS-22192. Na hidrólise de pasta branqueada foi utilizado o preparado enzimático Novozyme NS-22192.

As hidrólises enzimáticas decorreram durante 24 horas e, a análise dos monossacáridos obtidos durante estas hidrólises foi feita através do método de DNS (Ácido 3,5-dinitrossalicílico) e através de cromatografia iónica.

Constatou-se que na maioria dos ensaios, as hidrólises com carga de enzima superior, levaram a uma concentração de monossacáridos redutores e a uma conversão de reação superior. O preparado enzimático que converteu mais polissacáridos em monossacáridos foi o Cellic Ctec 2, sendo a conversão com a maior carga de enzima testada de 99,7%.

Os ensaios de hidrólise enzimática com diferentes concentrações de substrato, permitiram modelar os resultados com o modelo de Michaelis-Menten utilizando o software Matlab. Estimaram-se os parâmetros característicos do modelo nomeadamente a constante de Michaelis-Menten cujo valor foi 136,5 g/L e a velocidade máxima cujo valor apresentado foi 51,74 g/h.

Keywords

Paper Pulp, Cellulose, Hemicellulose, Cellulases, Enzymatic Hydrolysis, Reducing Sugars, Glucose, Xylose.

Abstract

The hydrolysis of pulp from the paper industry is being investigated internationally to try to convert its polysaccharides into monosaccharides. These are capable of being fermented so they can be used in the production of second generation bio fuels or in any other valuable bio products.

The purpose of this work was to study the enzymatic hydrolysis of kraft pulp, raw and bleached, provided by RAIZ- Instituto de Investigação da Floresta e do Papel. The hydrolysis process was studied analysing the effect of enzyme concentration as well as the effect of the substrate concentration.

The hydrolysis of raw pulp was tested using the following 5 different commercial enzymatic preparations: Cellic Ctec 2, Optimase, Serzym 42, Celluclast 1,5L and Novozyme NS-22192. Novozyme NS-22192 was used in the hydrolysis of the bleached pulp.

The enzymatic hydrolysis were made during 24 hours and the analyzes of the obtained monosaccharides were made through the DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) method and through ionic chromatography.

In most of the experiences, the hydrolysis with a higher charge of enzyme, produced the higher concentration of monosaccharides

The enzymatic preparation more efficient was Cellic Ctec 2, being the conversion, with the biggest charge of enzyme, 99,7% .

The experiences of enzymatic hydrolysis with different substrate concentrations allowed the modulation of the results with the Michaelis-Menten model by using Matlab software. The estimated parameters of the model, namely the constant of Michaelis-Menten, and the maximum reaction rate were of 136,5 g/L and 51,74 g/h respectively.

Índice Geral

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas.....	xii
Abreviaturas e Simbologias	xiv
Introdução	xvii
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. A relevância da indústria papelreira e da sua matéria-prima em Portugal	1
1.2. A química da madeira	2
1.2.1. A estrutura microscópica da madeira	4
1.2.2. A ultra estrutura da madeira	4
1.2.3. Celulose.....	5
1.2.4. Hemicelulose.....	7
1.2.5. Lenhina.....	8
1.2.6. Extratáveis.....	9
1.3. Processamento de pastas celulósicas.....	10
1.3.1. Processo Kraft	11
1.3.2. Reações dos polissacarídeos.....	12
1.3.3. Branqueamento das pastas Kraft	13
1.4. Enzimas	14
1.4.1. Determinação da atividade enzimática.....	15
1.4.2. Cinética Enzimática.....	16
1.4.2.1. Modelo de Michaelis-Menten	16
1.5. Celulases	19
1.6. Bioetanol	21
1.7. Objetivo do trabalho.....	22
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	23
2.1. Preparados enzimáticos comerciais.....	23
2.2. Caraterização das pastas kraft	23

2.3.	Medição da Atividade Celulásica.....	24
2.4.	Hidrólise Enzimática das pastas.....	25
2.5.	Método de Análise dos Açúcares Redutores.....	27
2.6.	Técnica de Cromatográfica Iônica.....	28
2.7.	Método de Modelação dos Resultados.....	29
Capítulo 3 – Análise e Discussão de Resultados.....		31
3.1.	Atividade dos Preparados Enzimáticos.....	31
3.2.	Hidrólises Enzimáticas das pastas kraft cruas.....	32
3.2.1.	Teste de contaminação microbiana.....	49
3.3.	Hidrólise enzimática de pasta branqueada.....	52
3.4.	Modelo cinético de Michaelis-Menten.....	55
Capítulo 4 – Conclusão.....		60
Referências Bibliográficas.....		62
Apêndices.....		65
Apêndice A – Exemplos de Cálculo.....		65
Apêndice B – Figuras Auxiliares.....		71
Apêndice C – Tabelas Auxiliares.....		76

Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies em 2010. (ICNF, 2013) ..	2
Figura 2 - Estrutura das camadas da parede celular da célula da madeira. Adaptado de (Sjöström, 1993).....	4
Figura 3 – Estrutura molecular da celulose. Adaptado de (Sixta, 2006).....	6
Figura 4 - Pontes de hidrogénio intermoleculares e intramoleculares na molécula de celulose. Adaptado (Sixta, 2006).	6
Figura 5 - Monossacáridos componentes das hemiceluloses. Adaptado de (Fengel e Wegener, 1984).	7
Figura 6 – Estrutura dos precursores da lenhina. Adaptado (Sixta, 2006).....	8
Figura 7 – Modelo do ajuste induzido do centro ativo da enzima com o substrato. Adaptado de (Ferreira, 2010).	14
Figura 8 – Efeito das concentrações de substrato e de enzima na velocidade das reações enzimáticas. Adaptado de (Coimbra, 2007).	18
Figura 9 – Representação gráfica da equação 4 – Lineweaver-Burk. Adaptado de (Coimbra, 2007).	19
Figura 10 – Mecanismo de degradação celulósica enzimática. Adaptado de (Béguin e Aubert, 1994).	20
Figura 11 – Montagem da hidrólise.	25
Figura 12 – Reação de oxidação-redução entre o DNS e um açúcar redutor.....	27
Figura 13 – Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Cellic Ctec 2, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	32
Figura 14 – Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Cellic Ctec 2, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	34
Figura 15 – Comparação de valores entre o método DNS e a cromatografia iónica.	36
Figura 17 – Comparação dos valores corrigidos com os valores não corrigidos para o preparado Cellic Ctec 2 com a carga de 15 FPU.....	38
Figura 17 – Comparação dos valores corrigidos com os valores não corrigidos para o preparado Celluclast 1,5L com a carga 15 FPU.....	38
Figura 18 - Concentração de açúcares durante a hidrólise enzimática com o Celluclast 1,5L, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	39

Figura 19 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com o Celluclast 1,5L, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	40
Figura 20 – Formação de espuma durante a noite, nos ensaios com a enzima Celluclast 1,5L. .	40
Figura 21 - Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Optimase, com diferentes cargas de preparado enzimático.	41
Figura 22 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Optimase, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	42
Figura 23 - Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Serzym 42, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	43
Figura 24 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Serzym 42, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	44
Figura 25 - Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Novozyme NS-22192, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	45
Figura 26 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Novozyme NS-22192, com diferentes cargas de preparado enzimático.....	46
Figura 27 - Comparação de valores entre os métodos DNS e cromatografia iónica.....	48
Figura 28 – Solução final da hidrólise enzimática com a Celluclast 1,5L.	50
Figura 29 – Cultura microbiana com a técnica do riscado onde se desenvolveram microrganismos.	51
Figura 30 - Concentração de açúcares para a hidrólise enzimática de pastas kraft crua e branqueada com Novozyme NS-22192, com carga de 35 FPU/g _{HC}	52
Figura 31 - Conversão de açúcares para a hidrólise enzimática de pastas kraft crua e branqueada com Novozyme NS-22192, com carga de 35 FPU/g _{HC}	53
Figura 32 – Comparação de valores entre os métodos DNS e cromatografia iónica.	55
Figura 33 - Concentração de açúcares para a hidrólise enzimática com diferentes concentrações de substrato utilizando o preparado Cellic Ctec 2, com carga de 35 FPU/g _{HC}	56
Figura 35 – Aplicação da equação de Lineweaver-Burk, para estimativa dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten.....	58
Figura 35 – Efeito das diferentes concentrações de substrato.....	58
Figura 36 – Cinética enzimática do preparado Cellic Ctec 2.	59
Figura 37 – Reação de Peeling dos polissacarídeos. Adaptado de (Sixta, 2006).	71

Figura 38 – Reação de Stopping dos polissacarídeos. Adaptado de (Sixta, 2006).....	71
Figura 39 – Curva de calibração da glucose pelo método DNS.....	72
Figura 40 – Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 2 horas com o preparado enzimático Cellic Ctec 2, 35 FPU/g _{HC}	72
Figura 41 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 24 horas com o preparado enzimático Cellic Ctec 2, 35 FPU/g _{HC}	73
Figura 42 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 2 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g _{HC}	73
Figura 43 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 24 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g _{HC}	74
Figura 44 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise das pastas branqueada às 2 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g _{HC}	74
Figura 45 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise das pastas branqueada às 24 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g _{HC}	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição das madeiras folhosas e resinosas. Adaptado de (Fengel e Wegener, 1984).	3
Tabela 2 – Cozimentos mais utilizados na indústria da pasta e do papel. Adaptado de (Smook, 2002).	11
Tabela 3 – Caracterização das pastas kraft.	24
Tabela 4 – Ensaios efetuados durante o trabalho desenvolvido.	26
Tabela 5 – Atividades celulásicas dos 5 preparados enzimáticas utilizados nas hidrólises.	31
Tabela 6 – Concentrações de glucose e xilose ao longo do tempo, obtidas através do cromatógrafo iónico, durante a hidrólise com o preparado Cellic Ctec 2, 35FPU/g _{HC}	35
Tabela 7 - Concentrações de glucose e xilose ao longo do tempo, obtidos através do cromatógrafo iónico, durante a hidrólise com o preparado Novozyme NS-22192, 35FPU/g _{HC}	47
Tabela 8 – Valores das constantes de velocidade cinética otimizadas utilizadas para cada modelo, de diferente carga de preparado enzimático e coeficiente de correlação entre o modelo calculado e os pontos experimentais.	49
Tabela 9 - Concentrações de glucose e xilose ao longo do tempo, obtidos através do cromatógrafo iónico, durante a hidrólise da pasta branqueada com o preparado Novozyme NS-22192, 35FPU/g _{HC}	54
Tabela 10 – Valores das velocidades iniciais para diferentes concentrações de substrato utilizado.	57
Tabela 11 – Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Cellic Ctec 2, 35 FPU/g _{HC}	76
Tabela 12 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Cellic Ctec 2, 25 FPU/g _{HC}	77
Tabela 13 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Cellic Ctec 2, 15 FPU/g _{HC}	77
Tabela 14 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Celluclast 1,5L, 35 FPU/g _{HC}	78
Tabela 15 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Celluclast 1,5L, 25 FPU/g _{HC}	78
Tabela 16 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Celluclast 1,5L, 15 FPU/g _{HC}	79
Tabela 17 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Optimase, 35 FPU/g _{HC}	79
Tabela 18 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Optimase, 25 FPU/g _{HC}	80
Tabela 19 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Optimase, 15 FPU/g _{HC}	80

Tabela 20 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Novozyme NS-22192, 35 FPU/g _{HC}	81
Tabela 21 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Novozyme NS-22192, 25 FPU/g _{HC}	81
Tabela 22 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Novozyme NS-22192, 15 FPU/g _{HC}	82
Tabela 23 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Serzym 42, 35 FPU/g _{HC}	82
Tabela 24 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Serzym 42, 25 FPU/g _{HC}	83
Tabela 25 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Serzym 42, 15 FPU/g _{HC}	83
Tabela 26 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio com pasta branqueada utilizando a Novozyme NS-22192, 35 FPU/g _{HC}	84
Tabela 27 – Valores obtidos para a hidrólise enzimática com massas menores (400g) usando a Cellic Ctec 2, 35FPU/g _{HC}	84
Tabela 28 - Valores obtidos para a hidrólise enzimática com massas menores (200g) usando a Cellic Ctec 2, 35FPU/g _{HC}	85

Abreviaturas e Simbologias

Abs	Absorvância
Abs _m	Absorvância média
AE	Atividade Enzimática (FPU/mL _{enzima})
AR	Açúcares redutores
b	Ordenada da origem de uma reta
C _{AR}	Concentração de açúcares redutores (g/L)
C _{AR_c}	Concentração de açúcares redutores corrigida (g/L)
CE	Carga do preparado enzimático por hidratos de carbono (FPU/g _{HC})
C _{Glu}	Concentração de glucose (g/L)
C _{Glu_c}	Concentração de glucose corrigida (g/L)
C _{HC}	Concentração de hidratos de carbono (g/L)
C _M	Concentração modelo de açúcares redutores (g/L)
C _{Pasta}	Concentração de sólidos secos (g/L)
C _T	Concentração teórica (g/L)
C _{Xil}	Concentração de xilose (g/L)
C _{Xil_c}	Concentração de xilose corrigida (g/L)
CZ	Carga do preparado enzimático (FPU)
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
E	Enzima
ES	Complexo enzima-substrato
F	Parede primária da parede celular
FD	Fator de diluição
f(V)	Função linear da evaporação
H	Humidade das pastas
HC	Hidratos de Carbono
K	Constante de equilíbrio
k	Constante de velocidade da reação
k ₁	Constante de velocidade da reação de formação de ES

k_{-1}	Constante de velocidade da reação de dissociação do complexo ES
k_2	Constante de velocidade de reação de formação de P
k_{35}	Constante de velocidade da reação com carga de preparado de 35 FPU
k_{25}	Constante de velocidade da reação com carga de preparado de 25 FPU
k_{15}	Constante de velocidade da reação com carga de preparado de 15 FPU
K_m	Constante de Michaelis – Menten (M)
m	Declive de uma reta
$m_{amostra}$	Massa da água na amostra (g)
m_{seca}	Massa da amostra seca (g)
$m_{talqual}$	Massa da amostra tal qual (g)
m_{AR}	Massa de açúcares redutores (g)
m_{AR_c}	Massa de açúcares redutores corrigida (g)
m_{Glu}	Massa de glucose (g)
m_{Glu_c}	Massa de glucose corrigida (g)
m_{HC}	Massa dos hidratos de carbono (g)
m_{Xil}	Massa de xilose (g)
m_{Xil_c}	Massa de xilose corrigida (g)
ML	Lamela média da parede celular
$r^2 (35)$	Coefficiente de correlação do modelo com carga de preparado de 35 FPU
$r^2 (25)$	Coefficiente de correlação do modelo com carga de preparado de 25 FPU
$r^2 (15)$	Coefficiente de correlação do modelo com carga de preparado de 15 FPU
R	Camada rugosa da parede celular
S	Substrato
SE	Solução enzimática
t	Tempo
T	Temperatura

Tampão	Solução tampão
v	Velocidade da reação enzimática
v_0	Velocidade inicial de reação
$V_{\text{água}}$	Volume de água (L)
V_{amostra}	Volume da amostra (L)
V_E	Volume de enzima (mL)
V_{filtrado}	Volume filtrado após hidrólise (L)
V_{final}	Volume final após hidrólise (L)
$V_{\text{Máx}}$	Velocidade máxima de reação
$V_{\text{Sólidos}}$	Volume de sólidos após hidrólise (mL)
$V_{\text{Solução}}$	Volume da solução (L)
V_{SE}	Volume da solução enzimática (mL)
$V_{\text{Tampão}}$	Volume de tampão (L)
W	Parede secundária da parede celular
W1	Camada externa da parede secundária
W2	Camada intermédia da parede secundária
W3	Camada interna da parede secundária
x	Conversão de açúcares redutores
x_M	Conversão modelo de açúcares redutores

Introdução

A madeira é um material complexo de substâncias poliméricas naturais: celulose, hemiceluloses e lenhina. Estas substâncias poliméricas não são uniformemente distribuídas na parede celular da madeira e as suas concentrações variam nas diferentes regiões morfológicas. Para entender as propriedades físicas e químicas da madeira é essencial estudar a química e a estrutura dessas substâncias poliméricas.

As enzimas têm sido utilizadas pelo homem há vários séculos. O emprego das enzimas começou bem antes de se conhecer a sua natureza e propriedades. A denominação de “enzima” (palavra que, em grego, significa “em leveduras”) foi utilizada pela primeira vez por Kühne, em 1878. Até 1897 acreditava-se que as enzimas só eram ativas em células vivas. Esse conceito alterou-se quando Büchner observou que, o extrato obtido por prensagem de células de leveduras, ainda possuía as propriedades para fermentar a sacarose (Ricardo e Teixeira, 1983).

O uso de enzimas na indústria da pasta e do papel tem ganho muita importância desde os anos 80. Apesar de muitas áreas ainda estarem em desenvolvimento, muitas aplicações de enzimas estão a ser incluídas no tratamento das pastas para a obtenção de fibras secundárias e para a modificação das características dessas fibras. Durante os últimos anos têm-se produzido cada vez mais enzimas capazes de modificar as características das pastas e do papel. Como resultado da utilização dessas enzimas verificam-se alterações significativas das propriedades físicas quer da pasta quer do papel (Coelho, Salgado, e Ribeiro, 2008).

O presente trabalho é estruturado em quatro capítulos e uma secção de apêndices. O primeiro capítulo consiste numa revisão bibliográfica, na qual se destacam três temas principais: a composição química da madeira, o processamento das pastas e a atividade de enzimas. No segundo capítulo são descritos os métodos e procedimentos experimentais que permitiram o desenvolvimento deste trabalho e a obtenção de resultados. O terceiro capítulo é dedicado à análise cuidada dos resultados obtidos, assim como à discussão dos mesmos. No último capítulo são apresentadas as principais conclusões do trabalho realizado.

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

1.1. A relevância da indústria papelreira e da sua matéria-prima em Portugal

O setor da Pasta e do Papel, ou seja, a indústria papelreira, em Portugal, é um sector predominantemente exportador, sendo que os destinos principais dessa exportação são os países comunitários, Espanha, França, Alemanha, Itália e Reino Unido (Celpa, 2013).

As trocas comerciais de pastas celulósicas e de papel em 2010 ultrapassaram o saldo comercial das trocas na indústria da madeira, cortiça e têxtil. Logo seria de esperar um investimento nesta área, de maneira a aumentar cada vez mais o fluxo de exportação (Celpa, 2013). Para além dos valores envolvidos nestas transações, as quais beneficiam o país, esta atividade envolve principalmente uma matéria-prima nacional, renovável, que é transformada em produtos renováveis, reutilizáveis e recicláveis (Ferreira, 2010).

As matérias-primas mais utilizadas no fabrico de pasta celulósica são essencialmente madeiras resinosas e folhosas. Em Portugal utiliza-se maioritariamente o Eucalipto, sendo a espécie mais recorrente em Portugal o *Eucalyptus globulus*, madeira folhosa. Esta espécie de Eucalipto encontra em Portugal condições ótimas para o seu desenvolvimento, como o clima e os solos, apresentando assim um crescimento rápido e uma forte tendência para um rendimento económico elevado (Ferreira, 2010).

Segundo a Portucel- Soporcel “Na atualidade, Portugal é o maior produtor mundial de pasta kraft branqueada obtida a partir desta madeira, sendo cerca de 40% desta pasta utilizada em fábricas integradas de pasta e papel nacionais” (Portucel-Soporcel, 2013).

Como se pode verificar, a importância desta indústria no panorama nacional faz da madeira uma matéria-prima com elevado potencial e, cada vez mais, alvo de estudos para desenvolvimento de novas aplicações.

Portugal tem grandes áreas florestais, as quais são a sua principal fonte de biomassa. A utilização deste recurso deve ser controlada e avaliada para se conseguir um aproveitamento desta vantagem que o país tem em relação a outros (Pontes, 2008). De acordo com a sexta revisão do Inventário Florestal Nacional em 2010 (ICNF, 2013) a área ocupada por povoamentos florestais em Portugal continental é dominada pelo eucalipto (Figura 1) que representa a maior área do país (812 000 ha; 26%), o sobreiro a segunda (737 000 ha; 23%), seguido do pinheiro-bravo (714 000 ha; 23%). A área

ocupada por espécies resinosas corresponde a 31% da floresta portuguesa, sendo a restante 69%, ocupada por espécies folhosas.

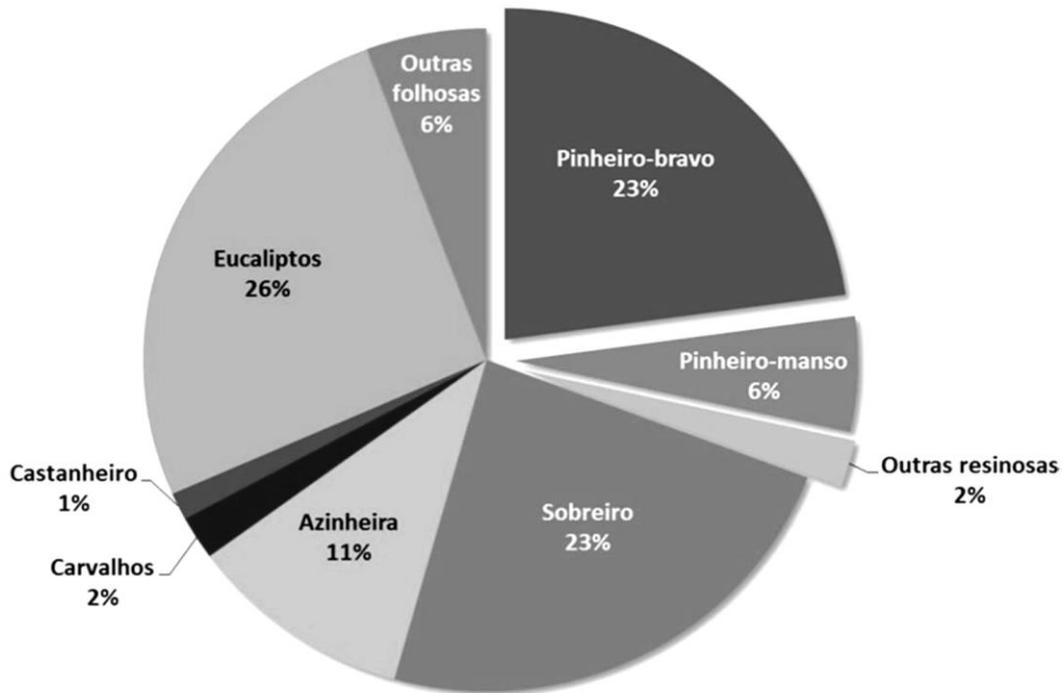


Figura 1 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies em 2010. (ICNF, 2013)

Sendo assim, pode concluir-se através da figura 1, que em Portugal o pinheiro e o eucalipto são as espécies florestais mais utilizadas, logo adquirem uma importância relevante na economia do país. O Eucalipto é a principal matéria-prima da indústria papelreira e o pinheiro bravo é a principal espécie consumida pela indústria do mobiliário (Pontes, 2008).

1.2. A química da madeira

A madeira é um material heterogéneo, isto é, apresenta uma estrutura celular diversificada, exibe um conjunto de propriedades que a tornam especialmente apta para uma vasta gama de usos independentemente da sua origem botânica. A composição química não se define com exatidão para a mesma espécie de árvores, pois, varia com diferentes fatores, a localização geográfica, a idade, as condições do solo, o tipo de madeira, etc. A madeira é um tecido biológico altamente organizado a nível celular e molecular (Rowell e Levan-Green, 2005).

A madeira é um material anisotrópico, higroscópico, biodegradável, combustível, isolante e química e mecanicamente resistente. Daí, o seu interesse para a indústria de pasta e de papel residir na qualidade e na quantidade, isto é, no rendimento das fibras.

A sua composição química apresenta cerca de 20-30% de lenhina, 40-50% de celulose, 20-35% de hemiceluloses e 1-3% de outras substâncias de baixo peso molecular. As substâncias de baixo peso molecular são essencialmente extratáveis, cinzas (menos que 1%) e compostos minerais presentes em pequenas quantidades (Sjöström, 1993). É necessário ter em atenção que as quantidades relativas dos componentes variam com o tipo de madeira e o tipo de parede celular.

A madeira é classificada em dois grupos, como já referido, as gimnospérmicas ou folhosas (“*hardwood*”) e as angiospérmicas ou resinosas (“*softwood*”). As folhosas são madeiras que apresentam maior densidade, maior durabilidade e mais dureza (Sjöström, 1993). Os dois grupos são essencialmente distinguidos através da proporção de polissacarídeos e lenhina. Nas folhosas, a percentagem desta última é maior do que nas resinosas, apresentando uma composição diferente de hemiceluloses relativamente aos açúcares constituintes, como se pode verificar através da tabela 1 (Sixta, 2006). Contudo, morfológicamente os dois grupos evidenciam em comum células orientadas segundo o eixo longitudinal e algumas células orientadas segundo o eixo transversal que, têm a função de armazenamento e condução de nutrientes (Rowell e Levan-Green, 2005; Sjöström, 1993).

Tabela 1 - Composição das madeiras folhosas e resinosas. Adaptado de (Fengel e Wegener, 1984).

Componentes (%)	Resinosas	Folhosas
Celulose	40-44	40-44
Hemiceluloses	30-32	15-35
Lenhina	25-32	18-35

O *Eucalyptus globulus*, é uma madeira folhosa, assim como o carvalho e o castanheiro.

1.2.1. A estrutura microscópica da madeira

Nas resinosas a estrutura é relativamente simples. O sistema axial ou vertical é maioritariamente composto por traqueídios axiais e no sistema radial ou horizontal, os raios, são maioritariamente compostos por células parênquimas radiais.

A estrutura típica das folhosas é bastante mais complicada do que a das resinosas. O sistema axial ou vertical é composto por elementos fibrosos de vários tipos, vasos de vários tamanhos, e células parênquimas axiais. Assim como nas resinosas, no sistema radial ou horizontal são os raios, que são compostos por células parênquimas radiais, mas mais diversificadas em termos de tamanho e forma (Rowell e Levan-Green, 2005).

1.2.2. A ultra estrutura da madeira

As células da madeira são formadas por várias camadas de parede celular, que se dividem em parede primária, F, e parede secundária, W. Cada célula individual é ligada com outra através da lamela média, ML, que apresenta um elevado teor de lenhina, mas devido à sua pequena espessura, apenas 20-25% da lenhina total da madeira está localizada nessa camada. A lamela média é também composta por substância pecticas com a função de consolidar a célula para esta não se desagregar (Rowell e Levan-Green, 2005). Na figura 2 podem observar-se as diferentes camadas da parede celular.

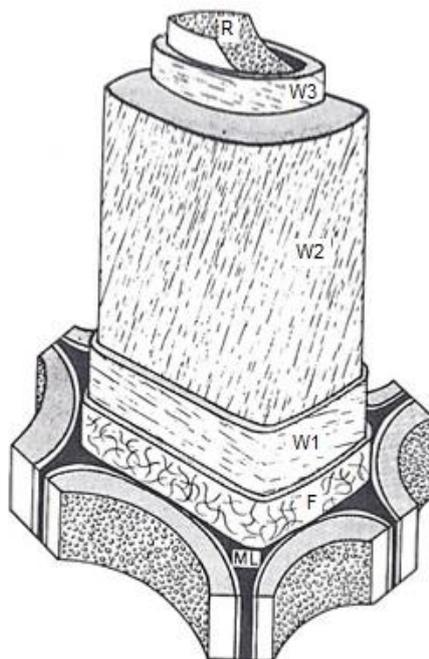


Figura 2 - Estrutura das camadas da parede celular da célula da madeira. Adaptado de (Sjöström, 1993).

A parede primária, F, é uma parede de espessura fina constituída por microfibrilas de celulose aleatoriamente orientadas (10%) e hemiceluloses (até 20%). Esta é a parede que apresenta o maior teor de lenhina e substâncias pécticas conferindo a consistência e coesão necessárias para proteger a célula de todos os impactos (Hill, 2007).

A parede secundária divide-se em três camadas distintas: a camada externa W1, onde as microfibrilas se entrecruzam e formam uma hélice; a camada intermédia W2, onde as microfibrilas se apresentam paralelas ao eixo longitudinal e, que apresenta uma espessura superior às outras camadas; e, por último, a camada interna W3, onde as microfibrilas se encontram paralelas às microfibrilas situadas nas camadas exteriores da célula. Sabe-se, também, que a quantidade de lenhina vai diminuindo da camada externa para a camada interna da parede secundária. Por outro lado, a quantidade de hemiceluloses vai aumentando. A quantidade de celulose aumenta até à parede W2, existindo na parede W3 uma ligeira diminuição desta. (Sjöström, 1993). Existe, também, uma camada rugosa interna depois da parede secundária designada por R.

Muitas das propriedades físicas, químicas e biológicas da madeira podem ser compreendidas através dos seus constituintes poliméricos. Os principais constituintes poliméricos da madeira são a celulose, a hemicelulose (compostos orgânicos) e a lenhina. Seguidamente, descrever-se-á a função de cada um desses componentes na estrutura da madeira.

1.2.3. Celulose

A celulose, constituinte maioritário da madeira representa 40-45% da massa seca. A celulose está localizada predominantemente na parede celular secundária, W.

A celulose é um homopolímero linear composto por unidades β -D-glucopiranosose agrupadas entre si através de ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), isto é, o hidroxilo do carbono 1, de um dos monómeros, está ligado ao carbono 4 do monómero adjacente. A unidade dimérica que se repete nesta molécula é denominada por celobiose. A molécula de celulose é completamente linear e tem uma forte tendência a formar pontes de hidrogénio, como se pode verificar na figura 3.



Figura 3 – Estrutura molecular da celulose. Adaptado de (Sixta, 2006).

As pontes de hidrogénio são intramoleculares, conferem rigidez à cadeia, e intermoleculares, responsáveis pela cristalinidade da celulose, ou seja, pela formação de fibrilas (Sixta, 2006; Sjöström, 1993). Na celulose a região altamente ordenada é a cristalina e a menos ordenada é a região amorfa.

Como consequência da sua estrutura fibrosa e das pontes de hidrogénio presentes, esta macromolécula é insolúvel na maioria dos solventes. As pontes de hidrogénio são também, responsáveis pela rigidez e pelas propriedades mecânicas atribuídas à madeira. Na figura 4 podem observar-se as pontes de hidrogénio intermoleculares e intramoleculares.

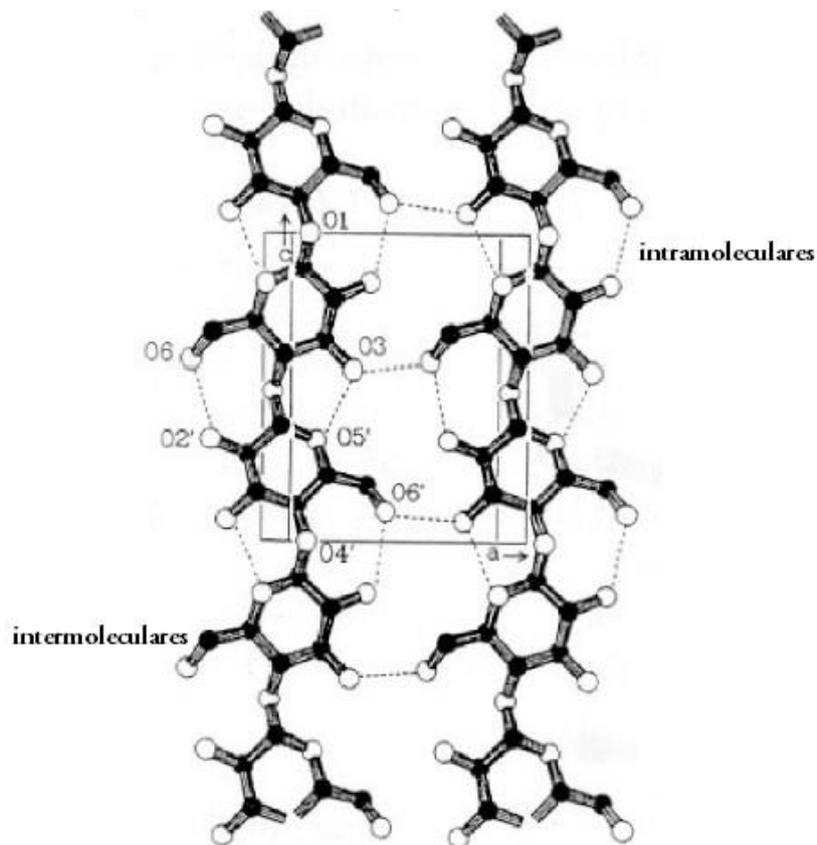


Figura 4 - Pontes de hidrogénio intermoleculares e intramoleculares na molécula de celulose. Adaptado (Sixta, 2006).

1.2.4. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados que apresentam um grau de polimerização mais baixo que o da celulose mas, que à semelhança desta, servem como material estrutural e como substância de reserva. Estas hemiceluloses são diferentes da celulose, porque consistem em várias unidades de açúcares ligados entre si (Sixta, 2006). As unidades de açúcares que formam as estruturas supramoleculares das hemiceluloses podem ser subdivididas em grupos tais, como pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glucose e manose), ácidos hexurónicos (ácido glucurónico) e desoxihexoses (ramnose), como se pode verificar na figura 5.

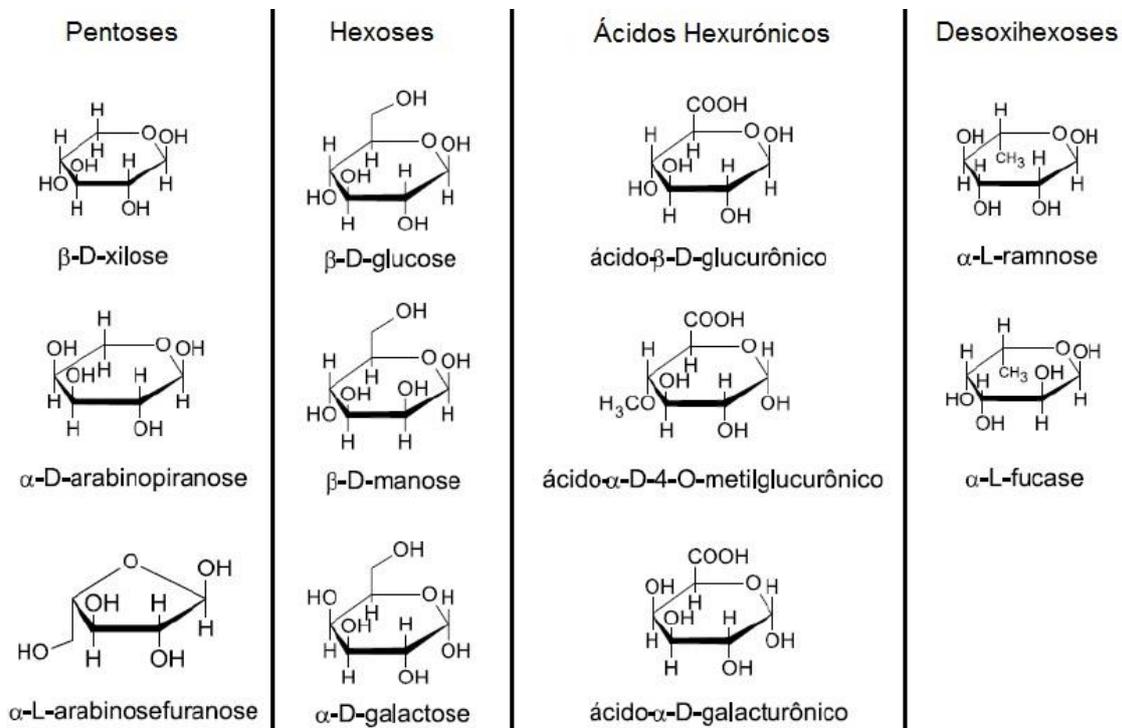


Figura 5 - Monossacáridos componentes das hemiceluloses. Adaptado de (Fengel e Wegener, 1984).

Os monossacarídeos ligam-se uns aos outros essencialmente por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), mas também se podem encontrar ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6), α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 6) (Sjöström, 1993).

As ramificações presentes nas cadeias das hemiceluloses não lhes permitem ter uma estrutura tão compacta como a da celulose, assim sendo, estas apresentam-se na madeira como uma substância amorfa, com maior reatividade, a qual é traduzida numa capacidade superior de hidrólise para a obtenção dos monossacarídeos que a constituem.

Sabe-se que, o teor e a composição dos componentes moleculares da madeira variam de espécie para espécie, logo as unidades de açúcares também variam. Nas madeiras resinosas as hemiceluloses são constituídas principalmente por glucomananas, galactoglucomananas e arabinanas, enquanto nas madeiras folhosas o componente maioritário é o glucuroxilano, existindo pequenas quantidades de glucomananas (Almeida, 2006).

1.2.5. Lenhina

Depois da celulose, a lenhina é a substância polimérica mais importante e abundante nas plantas. Esta estabelece as ligações entre as fibras da madeira conferindo firmeza e rigidez às fibras, sendo assim, a lenhina melhora as propriedades mecânicas da madeira. A lenhina é encontrada entre as células e a parede celular e é resistente ao ataque biológico, uma vez que, não apresenta ligações que sejam vulneráveis à hidrólise. É um polímero de estrutura amorfa, aromática, altamente ramificada e insolúvel em água (Sixta, 2006; Sjöström, 1993).

A lenhina é descrita como um material polifenólico proveniente da polimerização dos seus três precursores. Estes precursores são constituídos pelo álcool p-cumarílico (H), o álcool coniferílico (G) e o álcool sinapílico (S). Estes precursores não estão igualmente distribuídos nas folhosas e resinosas, uma vez que, a lenhina das folhosas é constituída predominantemente pelo álcool sinapílico e a lenhina das resinosas provém principalmente do álcool coniferílico. O álcool cumarílico é o precursor que menos contribui para a estrutura da lenhina tanto nas resinosas como nas folhosas (Fengel e Wegener, 1984; Sixta, 2006).

Na figura 6 podem-se observar as estruturas dos precursores da lenhina.



Figura 6 – Estrutura dos precursores da lenhina. Adaptado (Sixta, 2006).

A lenhina é uma macromolécula presente na madeira na forma de uma rede polimérica tridimensional não cristalina. Técnicas modernas de ressonância magnética nuclear (principalmente RMN de ^{13}C) têm sido aplicadas na identificação e caracterização das subestruturas presentes na lenhina. De acordo com a análise química dos resíduos obtidos em processos de produção de pasta, as principais ligações presentes na lenhina foram classificadas como β -O-4 (50%), β -5 (9-12%) e 5-5 (10-11%). Os tipos de ligações formadas na lenhina dependem da origem da madeira.

A lenhina é um polímero que confere firmeza e rigidez ao conjunto das fibras de celulose. Trata-se de uma estrutura resistente ao impacto, à compressão e à dobra. A sua função fundamental é atuar como material incorporado nas células, interpenetrando as fibrilas e dando resistência às paredes celulares. Devido ao caráter hidrofóbico da lenhina, a sua presença nas pastas, que dão origem ao papel, inibe a absorção da água e o inchamento das fibras, daí a necessidade da sua remoção nas pastas, que dão origem ao papel, utilizando o método de deslenhificação, termo técnico para a remoção da lenhina do tecido lenhocelulósico (Sjöström, 1993).

Apesar da lenhina ser parte integrante e necessária da madeira, a sua remoção para a formação das pastas celulósicas é necessária nos processos de cozimento e branqueamento, para se alcançar a individualização das fibras para posterior utilização no fabrico do papel e para remover a cor acastanhada que a lenhina dá às pastas. (Pontes, 2008).

1.2.6. Extratáveis

Os extratáveis são compostos da madeira com baixo peso molecular não pertencentes à parede celular, que podem ser extraídos em água ou em solventes orgânicos neutros (Fengel e Wegener, 1984).

Ao contrário dos polímeros estruturais da madeira, celulose, hemiceluloses e lenhina, a composição dos extratáveis varia consideravelmente entre as famílias das árvores. Alguns extratáveis têm um papel no metabolismo das células vivas e outros são produzidos para proteger a árvore de ataques exteriores por fungos ou insetos. A maioria dos extratáveis encontram-se na casca e nas raízes das árvores. Estes foram principalmente estudados por fabricantes de papel e celulose, pois causam problemas no

processo de produção e também influenciam várias propriedades do papel (Henriksson, Ek, e Gellerstedt, 2009).

Os extratáveis podem ser divididos em quatro grupos: gorduras/ácidos gordos, ésteres/esteroides, terpenos/terpenóides e compostos fenólicos.

1.3. Processamento de pastas celulósicas

O processamento de pastas celulósicas refere-se a qualquer processo de transformação da madeira em pasta para a produção de papel. A produção da pasta celulósica pode ser classificada mediante o tipo de cozimento ou pelo rendimento obtido. A rotura que acontece durante a formação da pasta celulósica dentro das fibras da madeira pode ser realizada mecanicamente, por combinações puramente térmicas, quimicamente, ou por combinações destes tratamentos (Smook, 2002).

O objetivo principal do processo de cozimento é libertar as fibras da madeira por deslenhificação com tratamentos físicos e/ou químicos. Neste processo, a lenhina é removida, de modo a que as fibras de celulose sejam facilmente separadas com tratamentos mecânicos suaves para obtenção de pastas celulósicas. As pastas mecânicas têm rendimentos entre os 93-97%, as pastas químico-mecânicas apresentam rendimentos de 85-95%. As pastas semi-químicas mostram rendimentos na ordem dos 70-80% e as pastas químicas por volta dos 50% (Sjöström, 1993).

Apesar do baixo rendimento das pastas químicas, este é o processo mais usado a nível industrial, sendo cerca de 85-90% das pastas obtidas mundialmente, pelo processo Kraft ou Sulfato e os restantes 10-15% divididos entre os processos ao Sulfito ácido ou Bissulfito (Sjöström, 1993; Smook, 2002).

Na tabela 2 pode encontrar-se um resumo das propriedades dos cozimentos mais utilizados na indústria papeleira.

Tabela 2 – Cozimentos mais utilizados na indústria da pasta e do papel. Adaptado de (Smook, 2002).

	Kraft	Sulfito ácido	Bissulfito
Químicos	$NaOH$ Na_2S	H_2SO_3 $M(HSO_3)$ ($M = Ca, Mg, Na, NH_4$)	$M(HSO_3)$ ($M = Mg, Na, NH_4$)
Tempo de cozedura (h)	2 - 4	4 - 20	2 - 4
pH do licor	13 - 14	1 - 2	3 - 5
Temperatura do cozimento (°C)	170 - 180	120 - 135	140 - 160

1.3.1. Processo Kraft

O processo Kraft envolve o cozimento das aparas de madeira em solução de hidróxido de sódio, $NaOH$, e em sulfito de sódio, Na_2S , onde o licor de cozimento inicial é denominado por licor branco ou lixivia branca. O ataque alcalino causa a fragmentação da molécula da lenhina em pequenos segmentos solúveis nos sais de sódio.

“Kraft” é a palavra alemã para força e o processo kraft produz papel com propriedade físicas fortes ou resistentes. No entanto o produto do cozimento deste processo é caracterizado por uma ligeira cor castanha o que ainda indica uma presença de lenhina considerável. Este processo é também associado à libertação de gases prejudiciais, principalmente sulfitos orgânicos, que causam uma preocupação a nível ambiental. Como o sulfato de sódio é o reagente mais tradicional neste processo, o cozimento Kraft pode ser referido como o processo Sulfato, tal como já apresentado (Smook, 2002).

Em relação ao cozimento ao sulfito ácido, o processo Kraft apresenta vantagens, visto que, consegue preservar as propriedades das fibras da madeira apresentando tempos de cozimento menores e conseguindo recuperar posteriormente os reagentes químicos utilizados. Os papéis obtidos por este processo apresentam resistências físico-mecânicas superiores (Smook, 2002).

Os reagentes ativos neste licor são os iões OH^- e SH^- , que são determinados através das seguintes reações químicas 1, 2 e 3 (Sjöström, 1993).



Equação 1



A remoção da lenhina, assim como as reações referentes aos polissacarídeos, são determinadas pela concentração de íons de hidróxido (OH^-) e de íons hidrogenossulfureto (SH^-). Sabe-se que os íons sulfureto (S^{2-}) diminuem a degradação dos polissacarídeos e aceleram a deslenhificação aumentando assim a qualidade das pastas obtidas por este processo.

1.3.2. Reações dos polissacarídeos

É necessário ter em atenção que o cozimento alcalino da madeira, através do processo Kraft, resulta numa considerável perda de hidratos de carbono na pasta, ou seja, perda de celuloses e hemiceluloses (Sjöström, 1993).

Em relação à celulose, devido à sua baixa reatividade e à sua baixa capacidade de solubilidade, esta é mais resistente ao ataque químico durante o cozimento, que apenas remove as zonas amorfas da macromolécula e, assim, reorganiza a sua estrutura tornando-a ainda mais cristalina (Smook, 2002).

Uma das reações dos polissacarídeos, que ocorre durante o cozimento kraft, é a hidrólise dos grupos acetilo no início do cozimento, o que leva à chamada reação peeling primária, o que significa perda do grupo terminal da cadeia do polissacarídeo. Quando o cozimento se encontra a altas temperaturas, através da hidrólise alcalina, ocorre a clivagem das ligações glicosídicas aleatoriamente. Desta clivagem aleatória resultam novas cadeias com grupos terminais suscetíveis a um peeling secundário (Sjöström, 1993; Smook, 2002).

A reação, que também pode ocorrer e que compete com o peeling, é a de stopping, sendo que, esta reação estabiliza o polissacarídeo envolvido. Nas figuras 37 e 38 do apêndice B podemos ver a reação de peeling e de stopping, respetivamente.

1.3.3. Branqueamento das pastas Kraft

A ligeira cor da pasta após o cozimento kraft é principalmente associada à lenhina que não foi removida durante o processo, sendo denominada de lenhina residual. Para alcançar um nível de brancura aceitável para a indústria do papel, a lenhina residual, os extratáveis, as impurezas inorgânicas e os resíduos de casca devem ser removidos da pasta. Uma outra forma de branquear as pastas é degradar as estruturas cromóforas (que absorvem a luz e apresentam cor) (Sjöström, 1993). Com a primeira opção obtêm-se pastas com um maior nível de brancura. Na indústria realizam-se sequências com diferentes etapas de branqueamento, com recurso a reagentes químicos, para uma alternância entre estágios ácidos e alcalinos.

No branqueamento, onde se remove a lenhina residual, utiliza-se o oxigénio (O_2), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o dióxido de cloro (ClO_2), o hipoclorito de sódio ($NaClO$) e o ozono (O_3) como - agentes químicos oxidantes. O dióxido de cloro atua como substituto do cloro molecular (Cl_2) (agente utilizado antigamente), pois este substituto é menos perigoso/nocivo. A indústria começou a alterar os procedimentos de branqueamento em grande parte para proteção do ambiente, essa substituição denominou-se por ECF (Elemental Chlorine Free) e foi introduzida nos anos 80 nos países europeus (Sixta, 2006; Smook, 2002).

O processo de branqueamento, através do qual permanece a lenhina e se removem apenas os cromóforos, é utilizado principalmente em pastas semiquímicas, químico-mecânicas e mecânicas, isto porque, este tipo de pasta é utilizado no fabrico de papel onde a qualidade do branqueamento não é importante nem as suas propriedades físicas (exemplo: jornais). Este branqueamento é realizado utilizando o peróxido de hidrogénio, seguindo o tipo de branqueamento em que não se aplica qualquer tipo de oxidante que contenha cloro na sua composição, designado por TCF (Totally chlorine free) (Sixta, 2006; Sjöström, 1993). Sendo que na indústria é necessário ter em atenção os custos dos reagentes e equipamentos, normalmente as sequências de branqueamento utilizam a combinação de reagentes em vários estágios de branqueamento.

1.4. Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente proteica e na natureza participam em várias reações bioquímicas, sendo o seu principal papel o controlo metabólico. As enzimas aceleram diferentes reações termodinamicamente favorecidas, sendo moléculas extremamente versáteis e estereoespecíficas. Devido a estas características, as enzimas foram ganhando elevada importância nos processos biotecnológicos (Ricardo e Teixeira, 1983).

Quimicamente, as enzimas são proteínas, que por sua vez são constituídas por longas cadeias de aminoácidos. O grupo α -amino de um aminoácido e o grupo α -carboxílico do aminoácido adjacente estão ligados por ligações peptídicas (Cabral, Aires-Barros, e Gama, 2003; Ricardo e Teixeira, 1983).

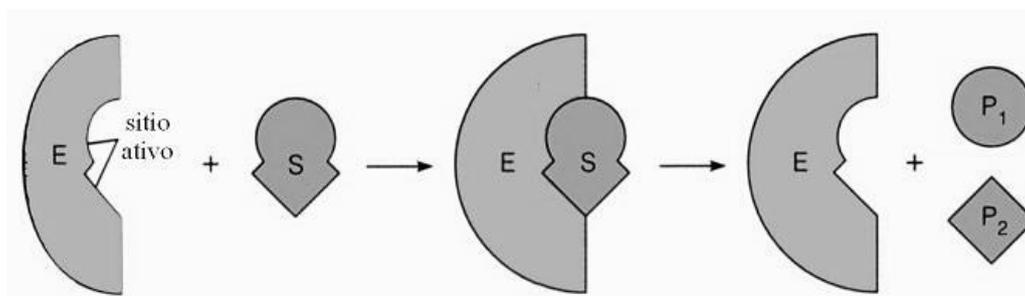


Figura 7 – Modelo do ajuste induzido do centro ativo da enzima com o substrato. Adaptado de (Ferreira, 2010).

Os reagentes que participam em reações enzimáticas denominam-se substratos. Cada enzima tem um carácter específico (são estereoespecíficas), ou seja, a enzima atua sobre um determinado substrato convertendo-o num determinado produto (Cabral et al., 2003). Do ponto de vista industrial, as enzimas apresentam vantagens em relação aos catalisadores químicos/tradicionais. Essas vantagens verificam-se principalmente quer na sua especificidade pelo substrato, quer na promoção de apenas uma reação bioquímica, uma vez que, formam os produtos desejados sem a simultânea formação de co-produtos. Para além disso a utilização de enzimas em detrimento da utilização de catalisadores tradicionais tem como benefício as condições suaves de reação e a redução de problemas ambientais e toxicológicos (Ricardo e Teixeira, 1983).

As enzimas contêm regiões, constituídas pelos grupos envolvidos na catálise, as quais se denominam de centros catalíticos. Para além disso, estas ainda contêm locais onde ocorre a ligação específica dos substratos, os centros de ligação dos substratos. Os centros de ligação dos substratos e o centro catalítico geralmente são vizinhos, podendo sobrepor-se frequentemente, constituindo assim o centro ativo (Cabral et al., 2003). A especificidade da ligação do substrato depende do arranjo dos átomos no centro ativo, como se pode observar na figura 7.

1.4.1. Determinação da atividade enzimática

Em dadas condições, uma molécula de enzima possui uma atividade característica. A medição dessa atividade é um aspeto essencial na caracterização de um sistema de reação enzimática. Tipicamente, as curvas de reação traduzem um abrandamento da velocidade ao longo do tempo originado por diversas causas, nomeadamente, inibição da enzima pelo produto, diminuição do grau de saturação da enzima pelo substrato em consequência do desaparecimento deste, aumento da importância da reação inversa à medida que os produtos se acumulam, desativação da enzima provocada pelo pH, pela temperatura ou por outros fatores.

A atividade enzimática depende de uma complexa variedade de fatores, nomeadamente, da natureza do substrato, da presença de co-fatores que a enzima requeira (iões metálicos ou compostos orgânicos chamados de co-enzimas), da natureza do solvente, do pH do meio e da temperatura do meio (Ricardo e Teixeira, 1983).

A atividade das enzimas pode necessitar da presença de ativadores ou pode ser afetada pela presença de inibidores. Para além disso, é necessário ter em atenção que cada enzima tem um pH ótimo característico, assim como, uma temperatura ótima. No caso de a meio de trabalho se atingir uma temperatura muito elevada ou um pH que não se encontre na gama certa, a enzima desativa por efeito da desnaturação da proteína (Cabral et al., 2003).

1.4.2. Cinética Enzimática

Na cinética enzimática o fundamental é a proporcionalidade da velocidade de reação em função da concentração de enzima ativa (Coelho et al., 2008; Ricardo e Teixeira, 1983).

O estudo da cinética enzimática foi iniciado por Adrien Brown no ano 1902. Este cientista descobriu que quando a concentração de substrato (S) é muito superior à concentração de enzima (E), a velocidade da reação torna-se independente da concentração de substrato. Assim, foi proposto um modelo em que a reação global é composta por três equações elementares, identificadas pela equação 4, 5 e 6 (Cornish-Bowden, 2012; Voet, Voet, e Pratt, 2002).



Nas equações assume-se o estabelecimento de um equilíbrio entre a enzima livre (E), o substrato (S) e o complexo enzima-substrato (ES). Como se pode observar pela equação 6, o complexo enzima-substrato dá origem ao produto de reação (P), regenerando também a enzima livre. Este é o passo mais lento da reação, logo será o passo limitante da velocidade global da reação. A equação 6 é considerada irreversível (Ricardo e Teixeira, 1983).

1.4.2.1. Modelo de Michaelis-Menten

Numa cinética enzimática a expressão geral para a velocidade da reação é dada pela equação 7 (Voet et al., 2002).

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \text{Equação 7}$$

Em 1913, dois cientistas, Michaelis e Menten, baseados em trabalhos já comprovados até à época, assumem o pressuposto de que $k_{-1} \gg k_2$, ou seja, que o primeiro passo da reação é um equilíbrio rápido. Este é o pressuposto do estado de equilíbrio. Com este pressuposto, apesar de não estar sempre correto, a equação 7 pode ser integrada.

Michaelis e Menten colocaram ainda a hipótese do estado estacionário: Com exceção dos tempos iniciais de reação, o complexo enzima-substrato (ES) mantém-se com concentração aproximadamente constante até que a concentração de substrato seja praticamente inexistente. Assim, a velocidade de conversão do complexo (ES) deve ser igual à velocidade de consumo do mesmo, por outras palavras (ES) tem um valor constante pois este complexo mantém-se em estado estacionário (equação 8) (Voet et al., 2002).

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \text{Equação 8}$$

A hipótese do estado-estacionário é mais geral que o pressuposto do equilíbrio. A constante de Michaelis-Menten é a constante de equilíbrio da reação de formação do complexo (ES), K_m (Cabral et al., 2003; Coelho et al., 2008; Ricardo e Teixeira, 1983).

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad \text{Equação 9}$$

O uso da velocidade inicial v_0 , em vez da velocidade, minimiza efeitos de determinados fatores assim como reações reversíveis, inibição da enzima pelos produtos e a progressiva inativação da enzima.

A velocidade máxima da reação enzimática, $V_{máx}$, ocorre a concentrações altas de substrato quando a enzima se encontra saturada, ou seja, quando a enzima se encontra toda na forma de complexo (ES).

$$V_{máx} = k_2([E] + [ES]) \quad \text{Equação 10}$$

Assim, combinando todas as equações apresentadas, obtém-se a equação 11.

$$v_0 = \frac{V_{máx} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 11}$$

A equação 11, traduz o modelo de Michelis-Menten e é a equação básica da cinética enzimática. A velocidade da reação enzimática pode aumentar hiperbolicamente ou linearmente. A velocidade da reação enzimática aumenta hiperbolicamente com a concentração do substrato (Voet et al., 2002).

A ordem da reação vai depender da concentração do substrato, sendo que, será de ordem zero quando a concentração do substrato é elevada e de 1ª ordem quando a concentração é baixa. A velocidade aumenta linearmente com a concentração de enzima se a concentração de substrato se mantiver constante para qualquer valor. Através da figura 8 pode observar-se o aumento hiperbólico e linear da velocidade (Coimbra, 2007).

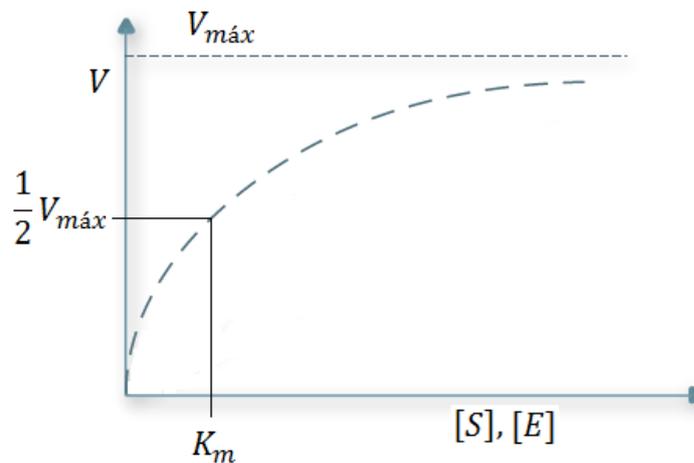


Figura 8 – Efeito das concentrações de substrato e de enzima na velocidade das reações enzimáticas. Adaptado de (Coimbra, 2007).

Existem vários métodos para a determinação dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten (equação 11). O método mais usual para essa determinação foi formulado por Lineweaver e Burk que usaram o inverso da equação de Michaelis-Menten (Voet et al., 2002).

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{máx}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad \text{Equação 12}$$

Como se pode observar pela figura 9, quanto menor for o valor da constante de Michaelis-Menten (K_m), maior será a formação de produtos, uma vez que existirá maior afinidade entre a enzima e o substrato (Coelho et al., 2008).

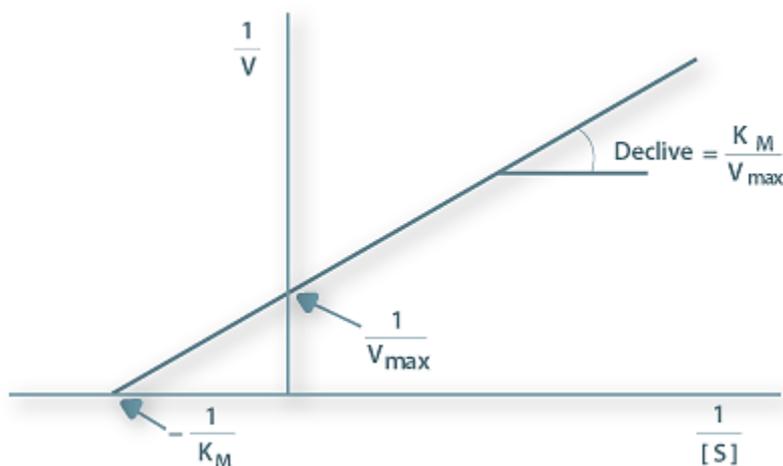


Figura 9 – Representação gráfica da equação 4 – Lineweaver-Burk.
Adaptado de (Coimbra, 2007).

1.5. Celulases

A degradação da cadeia polimérica da celulose requer a presença de enzimas pertencentes à classe das hidrolases, ou seja, enzimas hidrolíticas, nomeadamente celulases (Zhang, Hong, e Ye, 2009).

As celulases podem ser utilizadas em várias aplicações industriais, são utilizadas como componentes de detergentes, no tratamento de águas residuais, na indústria alimentar e como aditivos da ração animal. O sistema de celulases requer a atividade enzimática de três tipos de enzimas a trabalharem em conjunto, as endoglucanases, as exoglucanases ou celobiohidrolases e as β -glucosidases (Damaso, Farinas, e Salum, 2012).

As endoglucanases, mais propriamente endo- β -1,4-D-glucanases, agem de forma aleatória, clivando ligações β -1,4-glicosídicas, dentro da molécula da celulose. O seu modo de ação diminui significativamente a viscosidade específica do meio, devido às clivagens intramoleculares, resultando numa rápida diminuição do comprimento da cadeia (Wyman, Decker, Himmel, Brady, e Skopec, 2005).

As celobiohidrolases, as quais são frequentemente chamadas de exoglucanases, clivam os segmentos nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias expostas pelas endoglucanases, gerando a celobiose (Clarke, 1996; Wyman et al., 2005).

A β -glucosidase é a enzima que hidrolisa celobiose a unidades de glucose. A remoção da celobiose é um passo importante no processo da hidrólise enzimática, uma

vez que auxilia na redução do efeito inibitório de celobiose sobre a endoglucanases e as celobiohidrolases (Reese, Siu, e Levinson, 1950).

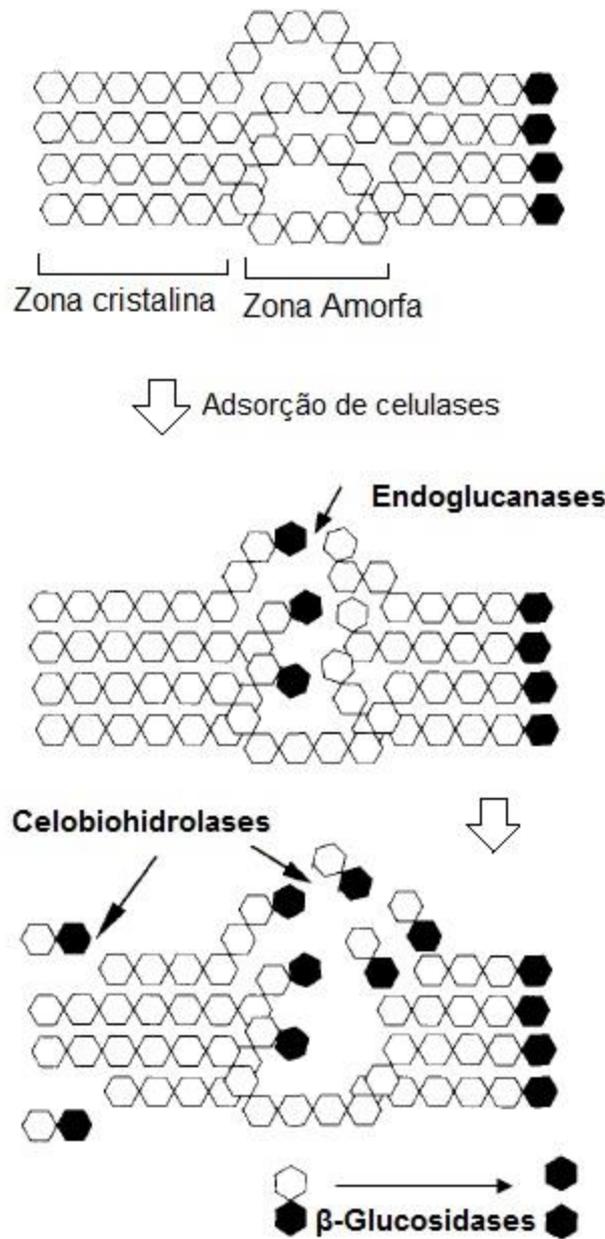


Figura 10 – Mecanismo de degradação celulósica enzimática.
Adaptado de (Béguin e Aubert, 1994).

Conforme mostra a figura 10, as endoglucanases e celobiohidrolases quebram a celulose em moléculas de celobiose, as quais são subsequentemente transformadas em moléculas de glicose pela β -glucosidase.

Na hidrólise enzimática há maior produção de monossacarídeos do que na hidrólise com ácido diluído, isto porque, a celulase catalisa apenas as reações de hidrólise e não reações de degradação de açúcares. A xilose na presença de ácidos fortes pode dar origem ao furfural como se pode ver na equação 13.



Por sua vez a glucose na presença de ácidos fortes pode dar origem ao hidroximetilfurfural, equação 14.



Tanto o furfural como o hidroximetilfurfural são compostos tóxicos, logo não desejáveis para a formação de biocombustíveis.

1.6. Bioetanol

O bioetanol (CH_3CH_2OH) é o etanol produzido por processos biológicos e é um biocombustível proveniente de biomassa renovável. A obtenção do etanol por processos biológicos é uma das soluções que visa uma redução do consumo excessivo de petróleo, que tem levado a um aumento da poluição ambiental. O bioetanol é um combustível oxigenado que contém cerca de 35% de oxigénio, logo leva a uma redução das emissões de NO_x relativamente ao combustível tradicional, a gasolina. Esta redução conduz a uma eficiência superior deste combustível e resulta numa combustão mais limpa a temperaturas baixas (Wang, Sharifzadeh, Templer, e Murphy, 2013).

Existem biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração. O bioetanol de primeira geração é fabricado a partir de bens essenciais, entrando em concorrência com as culturas alimentares. As matérias-primas para a produção bioetanol de primeira geração são o milho, o trigo, a beterraba, a colza, o girassol e a cana-de-açúcar. O bioetanol de segunda geração, é produzido a partir de resíduos de biomassa, nomeadamente, resíduos agrícolas, florestais e pastas de papel já processadas. Existem ainda em desenvolvimento os biocombustíveis de terceira geração que são produzidos através de algas (R. Antunes, 2010; Paulová, Patáková, Rychtera, e Melzoch, 2013).

Hoje em dia, este biocombustível é obtido essencialmente por fermentação de açúcares, amidos ou de biomassa celulósica. A produção comercial mais abundante é no Brasil, onde a matéria-prima é a cana-de-açúcar, e nos Estados Unidos, onde se utiliza a beterraba e o milho.

Uma das apostas da indústria Portuguesa tem sido na biorrefinaria que é uma unidade industrial que integra processos e equipamento de conversão de biomassa na produção de biocombustíveis, eletricidade, calor e derivados refinados. Este conceito de biorrefinaria é comparado às atuais refinarias de petróleo. Neste momento as indústrias papelarias estão interessadas em aproveitar os resíduos de biomassa e assim iniciou-se muita investigação sobre a produção de biocombustíveis através deste tipo de resíduos.

1.7. Objetivo do trabalho

Com este trabalho pretendeu-se estudar a hidrólise enzimática da pasta de papel proveniente do grupo Portucel Soporcel, com o objetivo de converter os polissacáridos existentes na pasta de papel a monossacáridos. O objetivo deste estudo é a obtenção de açúcares suscetíveis de fermentar e, assim obterem-se biocombustíveis de segunda geração.

Nesta hidrólise utilizaram-se cinco diferentes preparados enzimáticos comerciais, de maneira a proceder-se a uma comparação e conclusão sobre qual seria o melhor preparado enzimático, assim como a carga de preparado enzimático a usar.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Para a utilização dos diferentes preparados enzimáticos comerciais realizaram-se ensaios de atividade e, através desses resultados, calcularam-se os volumes de enzima necessários para as diferentes cargas enzimáticas a usar nos diferentes testes experimentais.

Após a realização da hidrólise quantificou-se os açúcares redutores obtidos pelo método DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico). Para além deste método, recorreu-se à técnica de cromatografia iónica, pois é uma técnica mais rigorosa, uma vez que permite identificar e diferenciar os monómeros dos açúcares redutores. É de realçar que, em todos os métodos realizaram-se duplicados.

Neste capítulo apresenta-se a descrição detalhada das técnicas e procedimentos executados no trabalho desenvolvido. Poderão, também, consultar-se todas as informações importantes relativas a instrumentos e materiais utilizados.

2.1. Preparados enzimáticos comerciais

Neste trabalho utilizaram-se 5 preparados enzimáticos diferentes, fornecidos pelo RAIZ para hidrolisar as pastas de papel. Os preparados foram Cellic Ctec 2, Optimase, Serzym 42, Celluclast 1,5L e Novozyme NS-22192. Para cada um dos preparados foi ensaiada a sua atividade antes do início das hidrólises enzimáticas.

Para cada um destes preparados enzimáticos foram testadas 3 diferentes cargas enzimáticas na hidrólise das pastas: 35, 25 e 15 FPU/g_{HC}.

2.2. Caracterização das pastas kraft

A caracterização das pastas kraft usadas foi feita previamente pelo RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e Papel. A tabela 3 é referente à caracterização da pasta kraft crua e branqueada.

Tabela 3 – Caracterização das pastas kraft.

Pastas kraft	Humidade (%)	Lenhina (%)	Orgânicos (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	C_{HC} (g/L)*
Crua	68,07	2,0	98,0	78,4	19,6	100
Branqueada	88,61	0,0	100	80,0	20,0	100

*As suspensões foram preparadas para 100g/L de hidratos de carbono na pasta.

2.3. Medição da Atividade Celulásica

A atividade enzimática das celulasas usadas varia de preparado enzimático para preparado enzimático. Neste caso foi necessário fazer 5 medições de atividade celulásica em duplicado uma vez que se usaram 5 diferentes preparados (Adney e Baker, 2008). A determinação da atividade enzimática foi realizada com base na hidrólise da celulose. O método utilizado foi o método do papel de filtro (filter paper unit – FPU). (Adney e Baker, 2008)

Neste procedimento utilizou-se solução tampão de citrato (0,05M) de pH=4,8, o substrato utilizado foi celulose, nomeadamente tiras de papel de filtro (1,0 x 6,0 cm) Whatman No. 1 (\approx 50 mg) e o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (Ghose, 1987).

Mediu-se a atividade enzimática da seguinte forma: colocou-se em cada tubo de ensaio com rolha uma tira de papel de filtro (substrato) enrolado, adicionou-se 1000 μ L da solução de tampão de citrato. De seguida os tubos de ensaio foram introduzidos num banho a 50°C, durante cerca de 10 minutos. Este procedimento serve para saturar a tira de papel de filtro em tampão citrato e otimizar as condições para o preparado enzimático.

De seguida, colocou-se em cada tubo de ensaio, 500 μ L de preparado enzimático diluído, em tampão. Incubaram-se os tubos durante 60 minutos, a 50°C. Após este período, colocaram-se os tubos num banho de água a ferver durante 5 minutos, e de seguida num banho de água gelada, durante aproximadamente 5 minutos. Depois do arrefecimento deixou-se os tubos de ensaio a repousarem, de maneira a não existirem sólidos suspensos. Posteriormente retirou-se 200 μ L de cada solução para uma cuvete e adicionou-se 2500 μ L de água ultra pura na cuvete. Utilizando o método DNS (referido

mais à frente) leu-se cada amostra no espectrofotômetro do UV-Visível a comprimento de onda igual a 540nm, contra um branco de tampão (sem enzima e sem papel de filtro). Foram efetuadas pelo menos duas diluições para cada preparado enzimático, de forma a encontrar duas diluições do preparado enzimático que permitam libertar um pouco mais e um pouco menos que 2,0 mg de glucose (Adney e Baker, 2008).

2.4. Hidrólise Enzimática das pastas

Em todas as hidrólises efetuadas o volume de água ultra pura foi de 2,0L.

Para a pasta kraft crua, a massa da pasta pesada para todos os ensaios, tendo em conta a humidade desta, foi 626,4g. Para a pasta kraft branqueada, a massa pesada foi 1755,9g. Adicionou-se a água ultra pura e aqueceu-se a solução num banho a 50°C com agitação de 100 rpm, com um agitador mecânico com pá em forma de hélice. Após a solução estar aquecida retirou-se uma amostra e mediu-se o pH. Adicionou-se a solução de preparado enzimático previamente aquecida a 50°C, e começou-se a contagem do tempo da reação. O ensaio durou 24h, e retiraram-se amostras do hidrolisado de 20 em 20 minutos até às 4h, de seguida retiraram-se amostras de 1 em 1 hora até às 8. O ensaio ficou a decorrer durante a noite e de manhã retiraram-se mais duas amostras, uma às 23h e uma às 24h. Na figura 11 apresenta-se o esquema de montagem da hidrólise.

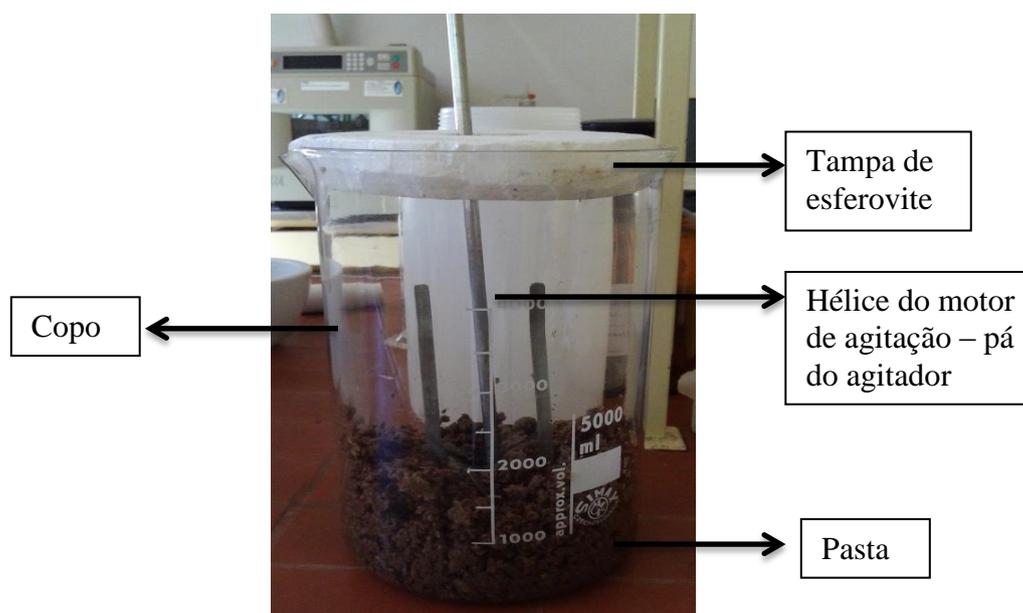


Figura 11 – Montagem da hidrólise.

Foi necessário ter em conta que sempre que foram retiradas amostras a temperatura e o pH da solução foram medidos, de forma a ajustá-los sempre que necessário. Para o controlo do pH utilizou-se uma solução de NaOH (3,75M) e uma solução de HCl (0,10M). Durante o ensaio o pH baixou ligeiramente, no máximo 1 valor nas últimas 12 horas.

Os cálculos para as massas de pastas pesadas, assim como os volumes utilizados de água ultra pura e do preparado enzimático utilizado encontram-se no apêndice A. Às 24h do ensaio deu-se por terminada a hidrólise enzimática e filtrou-se o hidrolisado. Na tabela 4 encontra-se o resumo de todas as hidrólises enzimáticas realizadas, onde CE corresponde à carga do preparado enzimático utilizado e $m_{\text{amostra_talqual}}$ à massa de pasta kraft pesada.

Tabela 4 – Ensaio efetuados durante o trabalho desenvolvido.

Tipo de pasta	Enzima	CE (FPU/g _{HC})	$m_{\text{amostra_talqual}}$ (g)	C _{HC} (g/L)
Crua	Cellic Ctec 2	35	626,4	100,00
		25		
		15		
	Optimase	35		
		25		
		15		
	Novozyme NS-22192	35		
		25		
		15		
	Celluclast	35		
		25		
		15		
	Serzym 42	35		
		25		
		15		
Cellic Ctec 2	35	400,0	62,58	
		200,0	31,29	
Branqueada	Novozyme NS-22192	35	1756	100,0

2.5. Método de Análise dos Açúcares Redutores

Para a determinação quantitativa de açúcares redutores foi utilizado um método espectrofotométrico baseado na formação de um composto de cor castanha por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por ação dos açúcares redutores.

Os açúcares simples ou monossacarídeos são moléculas que contêm simultaneamente várias funções álcool, e uma função redutora: aldeído ou cetona. Os monossacarídeos na sua forma aberta apresentam um grupo aldeído ou cetona que oxida facilmente a ácido carboxílico. Esta característica é usada de forma vantajosa com o reagente de DNS, onde a observação de uma determinada reação corada é indicadora da presença dos grupos referidos. Sendo assim, o método DNS para analisar os hidratos de carbono redutores, quer sejam mono-, di-, trí- ou outros oligómeros, é um método colorimétrico. O DNS quando aquecido em meio alcalino e na presença de um açúcar redutor, é reduzido formando um composto de cor castanho-vermelho, o ácido 3-amino-5-nitro-salicílico. A intensidade da cor que aparece é quantificada ao comprimento de onda de 540nm e é usada para determinar a quantidade de hidratos de carbono presentes nas amostras. A figura 12 mostra a reação de oxidação-redução do método DNS (Miller, 1959).

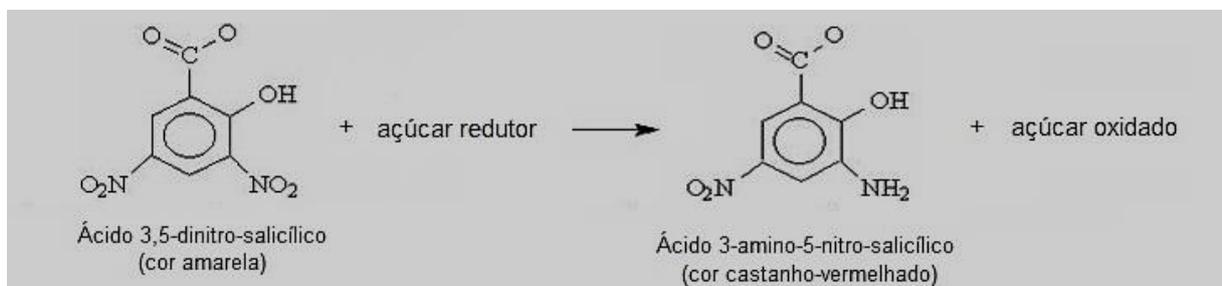


Figura 12 – Reação de oxidação-redução entre o DNS e um açúcar redutor.

A reação de oxidação-redução é quantitativa, permitindo a determinação do teor total de açúcar redutor na amostra analisada. Antes da análise DNS, centrifugou-se todas as amostras recolhidas a 4500rpm, durante 5 minutos.

Num tubo de ensaio com tampa, colocou-se 1000 µL da solução de tampão de citrato e adicionou-se 500 µL da amostra diluída a analisar. De seguida adicionou-se 3000 µL de DNS e agitou-se no vórtex.

Os tubos de ensaio foram levados a um banho a ferver durante 5 minutos e de seguida a um banho de água gelada durante aproximadamente 5 minutos.

Retirou-se 200 μL de cada solução para uma cuvete e adicionou-se 2500 μL de água ultra pura na cuvete. Leu-se no espectrofotómetro do UV-Visível a comprimento de onda igual a 540nm, contra um branco de tampão que sofreu o mesmo tratamento que as amostras.

No final conseguiu-se através da curva de calibração da glucose, que se encontra no apêndice A, figura 39, calcular-se a concentração de açúcares no decorrer do ensaio. É necessário ter em atenção que o método DNS não distingue os diferentes açúcares nem dímeros ou trímeros de monómeros, pois todos eles têm um terminal redutor e é apenas isso que o método DNS deteta.

2.6. Técnica de Cromatográfica Iónica

Na determinação quantitativa de monossacáridos que compõem os hidratos de carbono presentes na pasta kraft, tais como a Glucose, Xilose, Galactose, Arabinose e Manose, utilizou-se o cromatógrafo iónico com detetor de amperometria integrado (HPAEC-PAD). O aparelho utilizado de modelo DX500 Dionex é equipado com uma coluna Carbopac PA1 (4 x 250 mm) Dionex e uma pré-coluna Carbopac PA1 (4 x 50 mm) Dionex. Ao aparelho estão acoplados um detetor ED50 Electrochemical Detector Dionex operando no modo de “amperometria integrada” e um sistema de aquisição de dados Chromeleon Chromatography Management System (CMS versão 6.70).

O Eluente e o Regenerante foram soluções preparadas a partir da solução de NaOH a 50 % m/m, sendo que o eluente foi uma solução de NaOH 2,0 mM, e o Regenerante uma solução de NaOH 0,30 M.

A curva de calibração foi construída a partir de “soluções padrão mãe”, de 1000 mg/L Fucose, 500 mg/L Arabinose, 500 mg/L Galactose, 1000 mg/L Glucose, 1000 mg/L Xilose, 500 mg/L Manose.

As injeções dos padrões e amostras foram realizadas quando se garantiu que a respetiva solução se encontrava à temperatura ambiente. Após a obtenção dos resultados a curva de calibração foi construída de acordo com o método do padrão interno (método que permite transformar áreas de picos em concentrações de forma a obter as

percentagens relativas de cada componente) para cada um dos monossacarídeos (Glucose, Xilose, Galactose, Manose e Arabinose) (Gailing, Guibert, e Combes, 1998).

Foi necessário ter em atenção que o limite de deteção dos iões é da ordem dos ppm, assim, foi necessário realizar diluições elevadas (≈ 4000) quando as concentrações dos açúcares são elevadas, e diluições regulares (≈ 200) quando as concentrações dos açúcares são mais baixas.

O espetro obtido pela cromatografia, elaborado durante 70 minutos sendo os primeiros 22 minutos lavagem da coluna, apresenta 5 açúcares. O primeiro açúcar evidenciado no espetro é a fucose, açúcar padrão. Seguidamente surgem os açúcares presentes nas hidrólises enzimáticas. A concentração dos açúcares obtidos é calculada através da área dos picos que surgem no espetro.

2.7. Método de Modelação dos Resultados

A modelação dos resultados experimentais foi efetuada com base na equação cinética de primeira ordem, equação 15, uma vez que os resultados que se obtiveram das hidrólises eram coincidentes com cinéticas de primeira ordem. Esta equação tem em conta a concentração de substrato, $[S]$, o tempo, t , e a constante de velocidade cinética, k .

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k[S] \quad \text{Equação 15}$$

A concentração de substrato, $[S]$, foi calculada com base na equação 16.

$$[S] = [S]_0(1 - x) \quad \text{Equação 16}$$

Utilizando a equação 15 e 16 e integrando em ordem à conversão, obtém-se a equação 17. Esta equação é a conversão modelo, x_M . O desenvolvimento da integração encontra-se no apêndice A.

$$x_M = 1 - e^{-kt} \quad \text{Equação 17}$$

De seguida obteve-se a equação da concentração modelo, C_M , equação 18, multiplicando a equação 17 pela concentração teórica de cada ensaio, C_T . As concentrações modelo vão depender, assim, de um parâmetro experimental.

$$C_M = C_T[1 - e^{-kt}] \quad \text{Equação 18}$$

Para o cálculo do modelo, inicialmente foram arbitrados constantes de velocidades cinéticas, de maneira a otimizar o coeficiente de correlação entre os dados experimentais e o modelo.

Capítulo 3 – Análise e Discussão de Resultados

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados obtidos assim como a análise dos mesmos. As tabelas e gráficos auxiliares para a obtenção dos resultados apresentados encontram-se no apêndice B e C. Os exemplos de cálculos executados durante o trabalho encontram-se no apêndice A.

A metodologia deste estudo envolve quatro fases, onde a primeira corresponde à determinação da atividade enzimática, para cada um dos preparados enzimáticos, utilizados neste trabalho. A segunda fase é a hidrólise enzimática das pastas kraft cruas e a análise dos açúcares redutores, existindo, nesta fase, um teste de contaminação microbiana realizado para um dos preparados enzimáticos. A terceira fase abrange a hidrólise enzimática das pastas kraft branqueadas e a análise dos respectivos açúcares redutores. A última fase é a modelação de resultados através do Michealis-Menten utilizando o software MATLAB.

3.1. Atividade dos Preparados Enzimáticos

As medições das atividades dos preparados enzimáticos foram realizadas através do método descrito na seção 2.3 *Atividade Celulásica*. No apêndice A encontra-se o exemplo de cálculo para as atividades enzimáticas. Na tabela 5 encontram-se os valores das atividades dos preparados enzimáticos medidos, *AE*.

Tabela 5 – Atividades celulásicas dos 5 preparados enzimáticas utilizados nas hidrólises.

Preparado enzimático	AE (FPU/mL enzima)
Cellic Ctec 2	103,45
Optimase	38,340
Novozyme NS-22192	133,39
Celluclast 1,5L	59,480
Serzym 42	133,50

Através da tabela 5, pode-se esperar que os preparados enzimáticos Serzym 42 e o Novozyme NS-22192 sejam os preparados com os quais se obtenham melhores

resultados, e o Optimase o preparado com o qual se obtenham piores resultados, uma vez que é o que apresentou menor atividade celulásica.

3.2. Hidrólises Enzimáticas das pastas kraft cruas

Nos primeiros estudos de hidrólise enzimática efetuados foi utilizado o preparado enzimático Cellic Ctec 2 com cargas de preparado enzimático de 15, 25 e 35 FPU/g_{HC}, de modo a escolher a carga de preparado enzimático mais eficiente.

Para calcular a concentração de açúcares redutores utilizou-se a curva de calibração da glucose, figura 39 do apêndice A, cuja equação é a 19 a), e a absorvância medida em cada amostra, como se pode verificar através da equação 19 b). Nesta equação C_{AR} é a concentração dos açúcares redutores em g/L, A a absorvância, b e m os parâmetros da reta de calibração da glucose e FD o fator de diluição da amostra.

$$y = 0,1115x - 0,0107 \quad \text{Equação 19a)}$$

$$C_{AR} = \left(\frac{A-b}{m} \right) \times FD \quad \text{Equação 19b)}$$

Na figura 13 encontra-se a representação da concentração de açúcares redutores ao longo do ensaio, utilizando o método colorimétrico DNS, calculados para cada carga de preparado enzimático. As tabelas dos resultados encontram-se no apêndice C, tabela 11, 12 e 13.

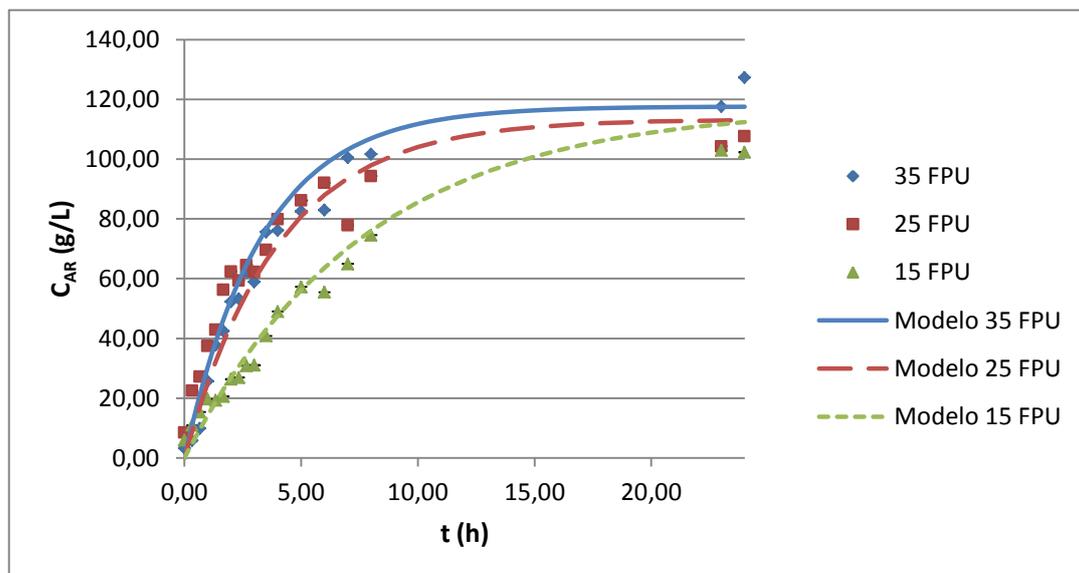


Figura 13 – Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Cellic Ctec 2, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Para os estudos com este preparado enzimático, os valores das constantes de velocidade cinética otimizadas, foram de $0,300 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio com carga de 35 FPU, $0,250 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio com carga de 25 FPU e $0,130 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio com carga de 15 FPU. Como referido, estes valores resultaram de um melhor ajuste entre os pontos experimentais e o modelo, que por sua vez apresentaram coeficientes de correlação aceitáveis.

Observando o gráfico concluiu-se que o modelo ajustado representa bem a evolução da hidrólise de cada carga de preparado enzimático. Os coeficientes de correlação, r^2 , foram 0,973 para a carga de preparado enzimático de 35 FPU, 0,954 para a carga de preparado enzimático de 25 FPU e 0,984 para a carga de preparado enzimático de 15 FPU.

Todas as cargas apresentaram a mesma tendência, mas como era de esperar, as cargas mais baixas não atingiram os valores de concentração da carga mais alta. É também de salientar que com a diminuição da carga de preparado enzimático, a constante de velocidade cinética também diminui, como era de esperar, uma vez que a velocidade da hidrólise diminui com a redução da quantidade de preparado enzimático, ou seja de biocatalisador.

Pela figura 13 verifica-se que os ensaios com as duas cargas de preparado enzimático superiores, 35 e 25 FPU, são muito próximos e que a maior diferença é apresentada pelo ensaio com 15 FPU. De facto, a diferença de velocidades é pouco significativa mostrando que no final de 24h já terminou a hidrólise das pastas.

Com os valores representados no gráfico da figura 13, construiu-se o gráfico da conversão de açúcares em função do tempo, através da equação 20, onde x é a conversão dos açúcares redutores e C_T a concentração teórica dos açúcares redutores.

$$x = \frac{C_{AR}(t)}{C_T} \quad \text{Equação 20}$$

A concentração teórica de açúcares redutores foi calculada através da equação 21, onde a concentração de sólidos secos, C_{Pasta} , é multiplicada por 2, pois o volume da solução inicial é 2,0 litros. Esse valor é também multiplicado por 0,98, que é a percentagem de compostos orgânicos existentes na pasta kraft crua. O valor 1,11 é a

razão entre a massa de 2 moléculas de glucose e a massa de uma molécula de celobiose. (Wyman et al., 2005)

$$C_T = \frac{2 \times C_{pasta} \times 0,98 \times 1,11}{V_{filtrado}} \quad \text{Equação 21}$$

O gráfico da figura 14 representa a conversão de açúcares redutores ao longo do tempo, apresentando, para além dos resultados experimentais, as curvas modelo para cada carga de preparado enzimático.

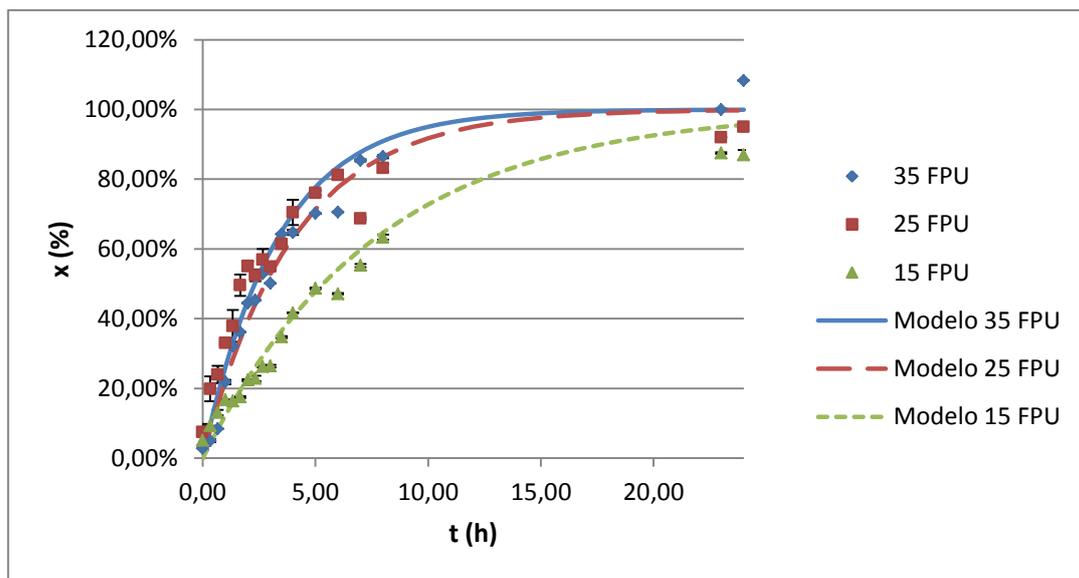


Figura 14 – Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Cellic Ctec 2, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Os coeficientes de correlação entre o modelo e os dados experimentais já foram apresentados anteriormente e como é evidente são iguais aos relativos às concentrações. Pode-se verificar que os modelos descrevem corretamente o comportamento das hidrólises.

Com este preparado enzimático, Cellic Ctec 2, notou-se que com a carga de 35 FPU/g_{HC}, a conversão ultrapassa os 100%, o que não pode acontecer. Este valor poderá ser justificado de duas maneiras diferentes, uma delas será por considerar apenas glucose ao pesar as pastas, o que não será de todo correto pois, sabe-se que existem na pasta 19,6% de hemiceluloses que por sua vez são constituídas por xilose para além da glucose e outros açúcares. Há uma percentagem de xilose cuja massa está a ser representada com o mesmo peso da glucose, o que não é correto. A segunda justificação para este valor será a humidade da pasta poder não ser exatamente a tabelada. Fazendo

os cálculos através da massa pesada de pasta e a quantidade de açúcares detetados pelo método DNS nota-se que a humidade seria inferior à humidade tabelada (68,07%) como se pode observar pela equação 22.

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{626,4 - 235,5}{626,4} \times 100 = 62,40\% \quad \text{Equação 22}$$

Sendo assim, e verificando as três cargas de preparado enzimático, assim como os seus resultados, pode-se afirmar que com a carga de 25 FPU/g_{HC}, poupar-se-ia dinheiro no preparado enzimático e converter-se-ia 95,01% dos açúcares redutores, o que indica que será mais eficiente a utilização dessa carga, em vez da carga superior, isto porque os preparados enzimáticos são bastante caros.

Devido aos resultados obtidos com este preparado enzimático utilizou-se outro método de determinação de açúcares redutores, descrito na secção 2.6. *Técnica de Cromatografia Iónica*. Comparou-se e provou-se através de um método mais rigoroso, a concentração de açúcares redutores que se converteu, durante a hidrólise da pasta, com o preparado enzimático em estudo com carga de 35 FPU/g_{HC}. Como já referido, a cromatografia, ao contrário do método DNS que identifica açúcares redutores, distingue os diferentes açúcares, ou seja, deteta e distingue os monossacáridos e não quantifica apenas os grupos redutores. Na tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos por cromatografia iónica para este ensaio.

Tabela 6 – Concentrações de glucose e xilose ao longo do tempo, obtidas por cromatografia iónica, durante a hidrólise com o preparado Cellic Ctec 2, 35FPU/g_{HC}.

<i>t</i> (h)	<i>FD</i>	<i>C_{Glu}</i> (g/L)	<i>C_{Xil}</i> (g/L)	<i>C_{AR}</i> (g/L)
0	100	1,630	1,260	2,890
2	1000	35,79	5,070	40,86
4	2000	67,05	12,99	80,04
8	4000	71,13	12,54	83,67
24	4000	92,61	24,68	117,3

Os espectros, no tempo de retenção da arabinose e galactose apresentam pequenas quantidades, abaixo do limite de deteção do cromatógrafo. No entanto, não é possível diluir menos as amostras, já que para isso a glucose e a xilose estariam mais concentradas, podendo ficar estes açúcares acima do limite de deteção do cromatógrafo.

As injeções no cromatógrafo foram realizadas em duplicado, logo, para cada tempo indicado na tabela, obtiveram-se 2 espectros e os valores apresentados na tabela são a média dos 2 valores. No apêndice B, encontram-se exemplos dos espectros obtidos para este ensaio, o espectro das 2 horas, na figura 40, e o espectro das 24 horas, na figura 41.

Como era de esperar, através da tabela 6 comprova-se que existe uma grande percentagem de xilose convertida nas pastas. Como se pode verificar também pela análise da tabela 6, a concentração de açúcares redutores total, para este ensaio é inferior aos 100% obtidos pelo método de DNS, pois a concentração teórica para este ensaio, calculada através da equação 16 é de 117,60g/L. Sendo a concentração final 117,29g/L, a conversão no final do ensaio deu 99,74%. Esta diferença nas conversões pode ser explicada devido à diferença de rigor dos dois métodos, isto é, o método DNS acusa todos os açúcares redutores, incluindo a arabinose e a galactose, para além de possíveis oligossacáridos de cadeia curta. O método de cromatografia iónica já só identifica os monómeros redutores mas como já referido poderiam existir moléculas de galactose e de arabinose que não foram quantificadas.

No gráfico apresentado na figura 15, encontra-se uma comparação entre os valores obtidos pelo método DNS e pela cromatografia iónica.

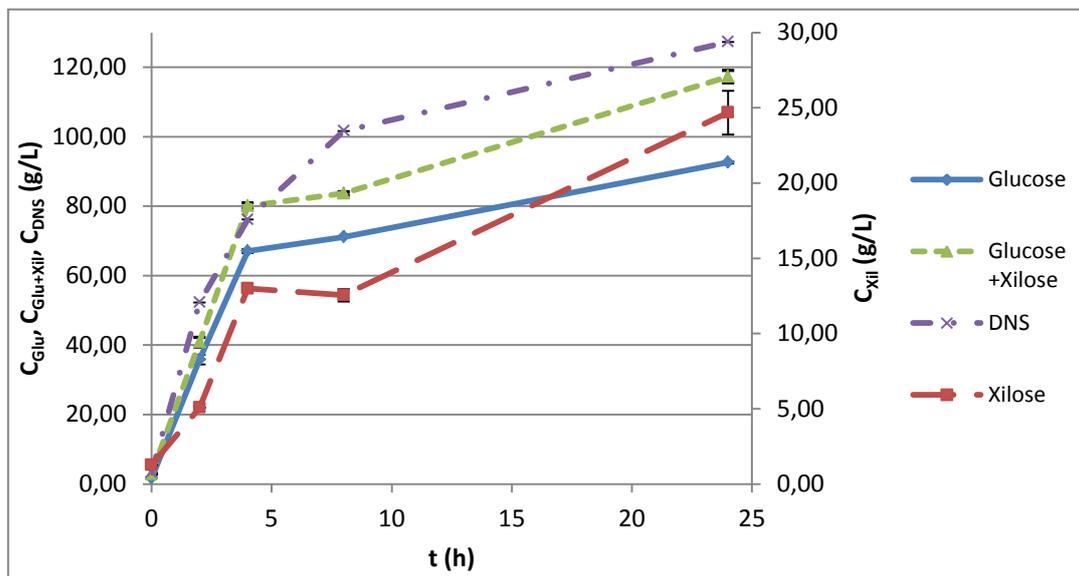


Figura 15 – Comparação de valores entre o método DNS e a cromatografia iónica.

Observando a figura 15, como era de esperar, a concentração de açúcares redutores pela técnica de cromatografia iónica dá inferior à concentração de açúcares redutores

pelo método DNS, devido às diferenças nos métodos já referidas. Deste gráfico pode também concluir-se que existe uma grande contribuição de xilose nos açúcares hidrolisados, sendo esta de 24,68 g/L, contribuindo com cerca de 21% dos açúcares redutores, a restante percentagem corresponde à glucose.

No final dos ensaios com este preparado enzimático, Cellic Ctec 2, resolveu-se começar a deixar o exaustor ligado durante a noite enquanto os ensaios decorriam, uma vez que a atividade do preparado deixava um odor intenso na sala. É de notar que durante os ensaios com este preparado, o volume final da solução sem filtração foi igual ao volume inicial da solução, 2,0 L.

O segundo estudo efetuado foi com o preparado enzimático, Celluclast 1,5L. Nos três ensaios realizados com este preparado observou-se uma grande evaporação. Para verificar se a taxa de evaporação tinha um impacto significativo nos resultados finais, fez-se uma correção introduzindo como fator de correção, uma função linear da evaporação (exemplo de cálculo apresentado no apêndice A). Como se sabe a evaporação não é igual para os todos os tempos da hidrólise, logo, não faria sentido utilizar o volume final medido, para os cálculos intermédios. Assim, representou-se a evaporação como uma função linear entre o volume inicial de solução, 2,0 litros, e o volume final medido, retirando os sólidos em ambos os volumes. A equação 23 foi utilizada para calcular a massa de açúcares redutores corrigida, m_{AR_c} , utilizando a massa de açúcares redutores não corrigida, m_{AR} , o volume de filtrado, $V_{filtrado}$, o volume da solução inicial, $V_{Solução}$, e o volume de sólidos, $V_{Sólidos}$.

$$m_{AR_c} = m_{AR} \frac{V_{filtrado}}{V_{Solução} - V_{Sólidos}} \quad \text{Equação 23}$$

Através da equação 24, calculou-se a concentração de açúcares redutores corrigidos, C_{AR_c} , tendo em conta a massa de açúcares redutores corrigida, m_{AR_c} , e a função linear da evaporação em relação ao tempo, $f(V)$.

$$C_{AR_c} = \frac{m_{AR_c}}{f(V)} \quad \text{Equação 24}$$

Os gráficos 16 e 17 comparam os valores corrigidos e os valores não corrigidos das concentrações dos açúcares redutores para o ensaio da Cellic Ctec 2 e o da Celluclast 1,5L com carga 15FPU/g_{HC} para ambos.

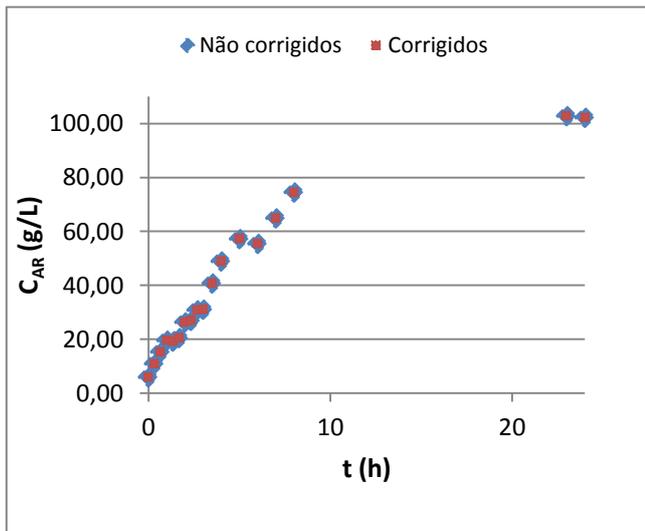


Figura 17 – Comparação dos valores corrigidos com os valores não corrigidos para o preparado Cellic Ctec 2 com a carga de 15 FPU.

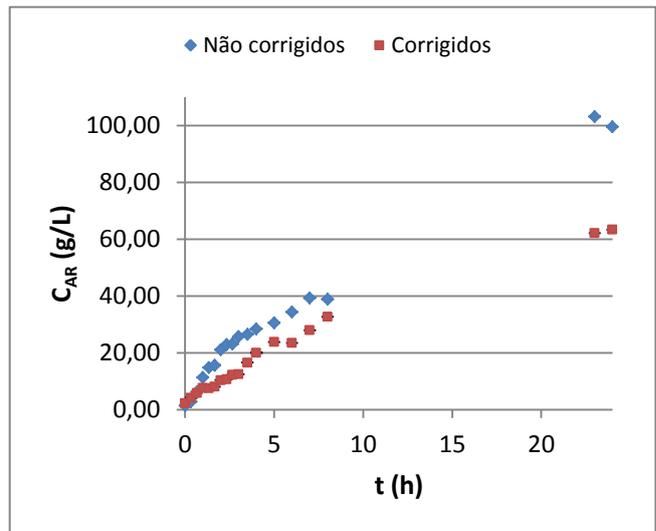


Figura 17 – Comparação dos valores corrigidos com os valores não corrigidos para o preparado Celluclast 1,5L com a carga 15 FPU.

Como se pode observar na figura 16, não existe qualquer diferença entre os valores corrigidos e os valores não corrigidos para o preparado Cellic Ctec 2, pois não houve evaporação durante os ensaios. Já na figura 17, os valores corrigidos são bastante diferentes dos valores não corrigidos, isto porque, como existiu uma grande taxa de evaporação, os açúcares detetados encontram-se mais concentrados. O único componente que evapora é a água. Assim, todos os cálculos a partir deste preparado enzimático serão realizados utilizando os valores corrigidos, pois observou-se uma taxa de evaporação grande para todos os restantes ensaios.

O gráfico da figura 18 representa a concentração de açúcares redutores ao longo do ensaio, utilizando o método colorimétrico DNS para as diferentes cargas de preparado enzimático. Utilizaram-se as tabelas do apêndice C, tabela 14, 15 e 16 para a realização deste gráfico.

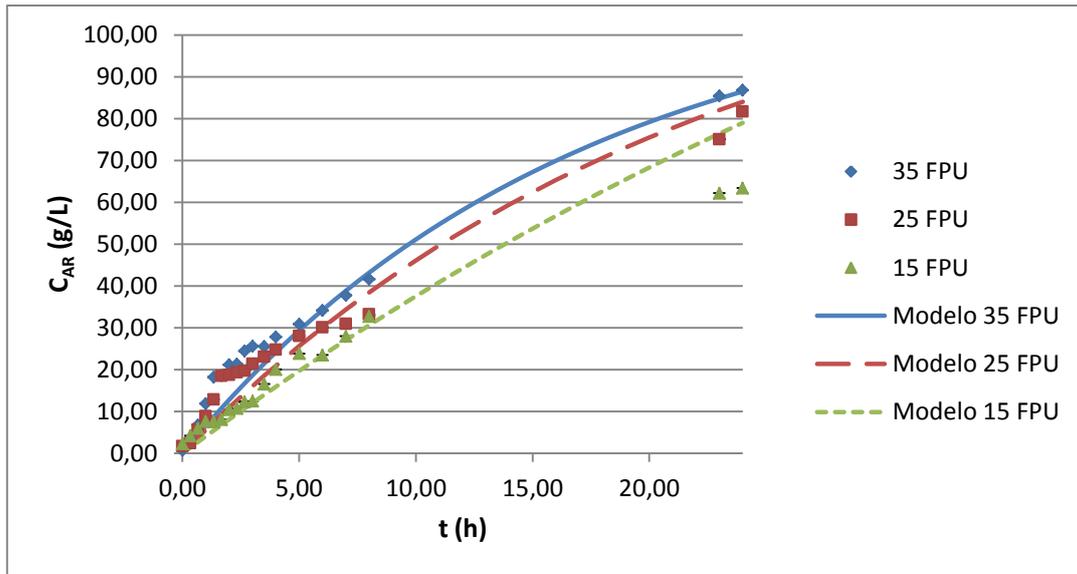


Figura 18 - Concentração de açúcares durante a hidrólise enzimática com o Celluclast 1,5L, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Aplicando o modelo e ajustando aos dados experimentais, as constantes de velocidade cinética otimizadas foram 0,060, 0,045 e 0,020 h^{-1} para os ensaios com carga de preparado enzimático de 35, 25 e 15 FPU/ g_{HC} , respectivamente.

Observando o gráfico conclui-se que com este preparado enzimático é bastante notória a diferença de concentrações dos açúcares redutores pelo método DNS, com as diferentes cargas enzimáticas. Como era de esperar a concentração de açúcares redutores superior é conseguida utilizando a carga de preparado enzimático superior. O modelo apresenta um coeficiente de correlação para com os dados experimentais de 0,983, 0,978 e 0,986 para as cargas de preparado enzimático de 35, 25 e 15 FPU/ g_{HC} , respectivamente.

Através da figura 18 verifica-se que o modelo da carga de preparado enzimático de 15 FPU/ g_{HC} atinge um valor bastante diferente do valor experimental, para os tempos finais da hidrólise. Esta diferença pode ocorrer devido a uma diminuição da velocidade cinética nos tempos finais da hidrólise, já que existe muito menos enzima que nos restantes, podendo esta encontrar-se saturada.

O gráfico da figura 19 apresenta a conversão dos açúcares redutores em função do tempo do ensaio, assim como o modelo para cada carga, com as constantes cinéticas já referidas.

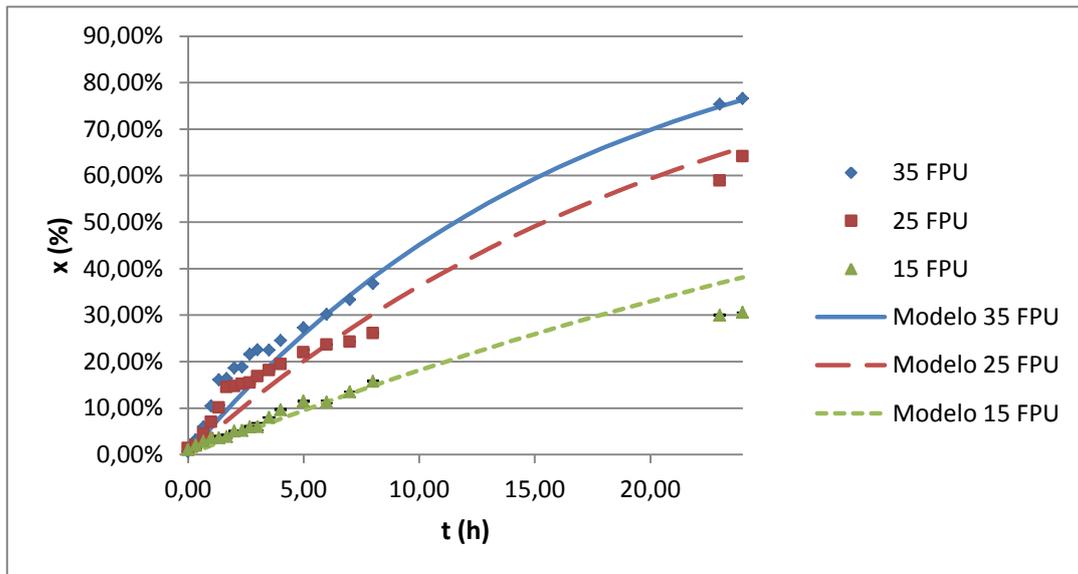


Figura 19 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com o Celluclast 1,5L, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Com este preparado enzimático, a carga de 35 FPU/g_{HC}, deu uma conversão de 76,62%, já com a carga de 25FPU/g_{HC}, a conversão deu 64,20%. Assim, como no primeiro preparado, a diferença de conversões não é muito significativa, e seria necessário recorrer a um estudo de viabilidade económica para se concluir qual a melhor carga de preparado a utilizar. Este estudo utilizar-se-ia para saber se compensaria o valor monetário a gastar com a maior carga de preparado enzimático para se obter a conversão de açúcares redutores referida, ou se não seria mais eficiente utilizar a carga de preparado de 25 FPU/g_{HC}.

Durante os três ensaios, com diferentes cargas de preparado enzimáticos, com o preparado Celluclast 1,5L, observou-se que durante a noite existia uma grande tendência para a formação de espuma, como se pode ver pela figura 20.

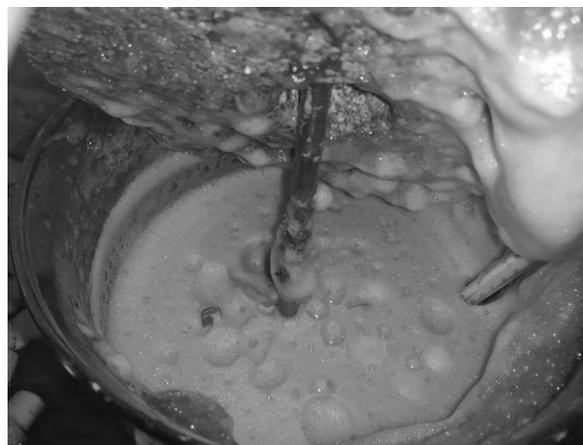


Figura 20 – Formação de espuma durante a noite, nos ensaios com a enzima Celluclast 1,5L.

Não se esperava a formação de espuma durante as hidrólises, sendo assim, consultou-se a ficha do produtor do preparado enzimático (Novozymes, 2012), e verificou-se que este preparado enzimático foi produzido pelo microrganismo “*Trichoderma reesei*”, fungo da podridão branca da madeira. Suspeitou-se que a espuma poderia ser proveniente duma contaminação microbiana do preparado enzimático. Sendo assim, realizaram-se testes de contaminação microbiana, detalhados na seção seguinte *3.2.1 Teste de contaminação microbiana*.

O preparado enzimático utilizado nas hidrólises seguintes foi a Optimase. Este preparado, como já referido, era o que apresentava a atividade enzimática mais baixa, logo eram de esperar baixas concentrações de açúcares hidrolisados assim como a conversão destes.

Na figura 21 encontra-se a representação da concentração de açúcares redutores ao longo do ensaio, obtidas pelo método DNS, calculadas para cada carga de preparado enzimático. Nas tabelas 17, 18 e 19 do apêndice C, encontram-se os resultados obtidos.

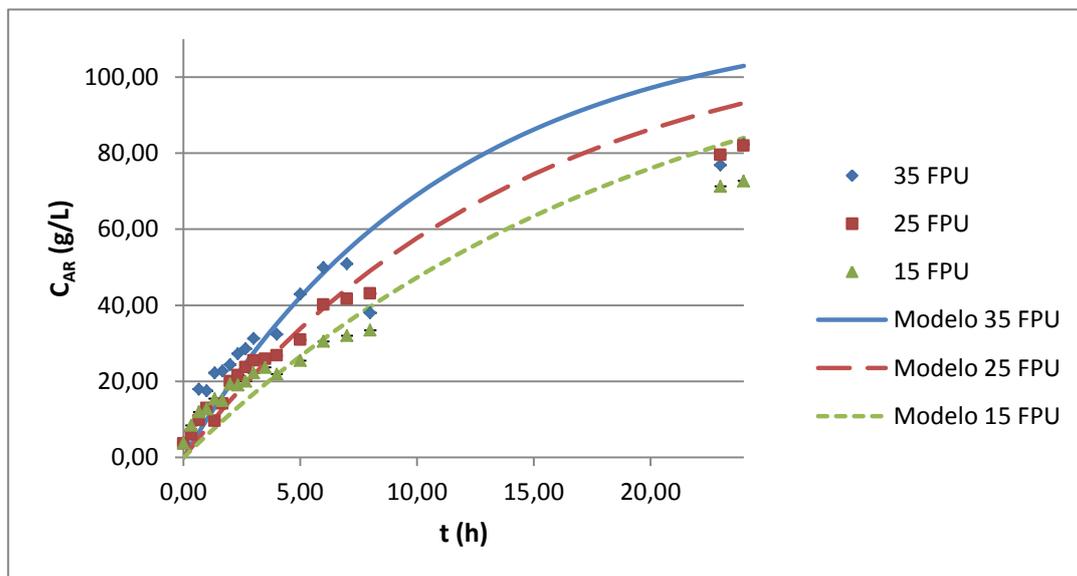


Figura 21 - Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Optimase, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Aplicando o modelo e ajustando aos dados experimentais, para o estudo com o preparado enzimático Optimase, as constantes de velocidade cinética otimizadas foram 0,090, 0,070 e 0,050 h⁻¹ para as cargas de preparado enzimático de 35, 25 e 15 FPU/g_{HC}, respetivamente. Os coeficientes de correlação entre o modelo e os pontos experimentais foram 0,947, 0,992 e 0,987 para as cargas de preparado enzimático de 35, 25 e 15

FPU/g_{HC}, respetivamente. Apesar do coeficiente de correlação entre o modelo e os pontos experimentais serem aceitáveis, o modelo não descreve o comportamento experimental nos tempos finais das hidrólises, como se pode observar pela figura 21. Através do cálculo do modelo seria de esperar, concentrações de açúcares redutores superiores para todas as cargas deste preparado enzimático.

Assim como já referido anteriormente, a atividade enzimática deste preparado é bastante baixa, sendo assim, a velocidade de reação poderá seguir um comportamento diferente nos tempos finais dos ensaios, levando a concentrações e posteriores conversões mais baixas do que era esperado.

Observando o gráfico da figura 21, com a carga de preparado enzimático de 25 FPU/g_{HC} obtiveram-se maiores concentrações de açúcares hidrolisados. Durante os ensaios com este preparado enzimático o meio reacional não se tornou líquido ao longo do tempo, formou-se uma suspensão. Verificou-se durante estes ensaios que se tratava de uma suspensão de 2 fases, cujas amostras não eram representativas e que portanto originou erros. Apesar de se ter centrifugado as amostras a 4500 rpm durante 5 minutos, a quantidade de sólidos em suspensão era grande e essa será essa a explicação para os resultados obtidos pelo método DNS.

No gráfico da figura 22 é apresentada a conversão dos açúcares redutores ao longo do tempo do ensaio, apresenta-se também as curvas modelo para cada carga de preparado enzimático.

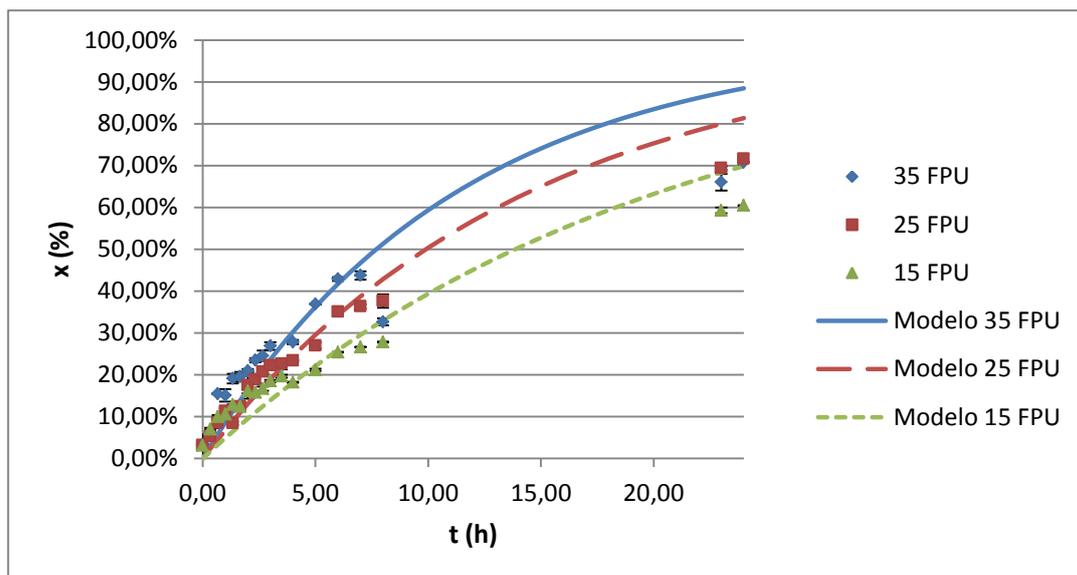


Figura 22 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Optimase, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Observando o gráfico da figura 22 retiram-se as mesmas conclusões que se retirou do gráfico da figura 21, isto é, apesar dos coeficientes de correlação entre o modelo e os pontos experimentais serem aceitáveis, nos tempos finais das hidrólises as conversões obtidas experimentalmente são bastante inferiores às conversões do modelo, para todas as cargas de preparado enzimático.

Apesar da baixa atividade enzimática, este preparado apresentou conversões de cerca de 70%, quer para a carga de preparado enzimático de 35 FPU/g_{HC}, quer para a carga de 25 FPU/g_{HC}. Neste caso, se se pudesse tirar conclusões poderia afirmar-se que era mais eficiente utilizar a carga de 25 FPU/g_{HC}, uma vez que atinge a mesma conversão que a carga superior e gastar-se-ia menos dinheiro com esta carga.

Seguidamente apresentam-se os resultados para o preparado enzimático Serzym 42. No gráfico da figura 23 encontra-se a concentração dos açúcares redutores em função do tempo de ensaio, obtida pelo método DNS. No apêndice C encontram-se as tabelas dos resultados, tabela 23, 24 e 25.

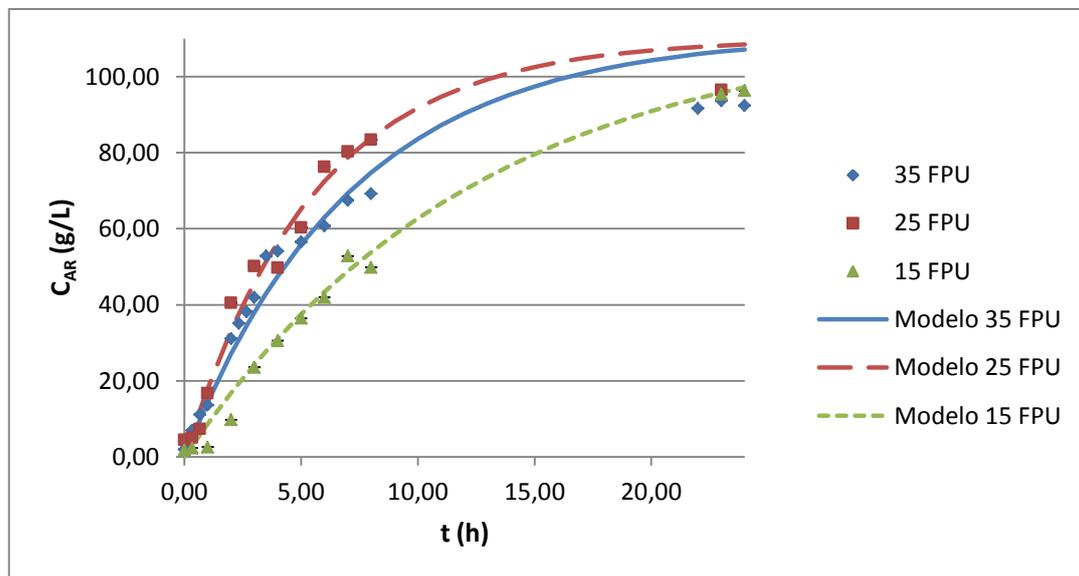


Figura 23 - Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Serzym 42, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Para o preparado Serzym 42, aplicando o modelo e ajustando aos dados experimentais, as constantes de velocidade cinética otimizadas foram 0,140, 0,180 e 0,080 h⁻¹ para as cargas de preparado enzimático de 35, 25 e 15 FPU/g_{HC}, respetivamente.

Os coeficientes de correlação entre o modelo e os pontos experimentais são 0,977, 0,976 e 0,992 para as cargas de preparado enzimático de 35, 25 e 15 FPU/g_{HC}, respectivamente. Seriam de esperar concentrações superiores com as cargas de preparado enzimático de 35 e 25 FPU/g_{HC}, como se pode observar pela evolução do modelo para cada uma dessas cargas. Já para a carga de 15 FPU/g_{HC}, a concentração obtida é apenas inferior em 1g/L da concentração esperada. Assim, poderá supor-se que existiu limitação por substrato nos ensaios com carga de preparado enzimático superior, visto que os valores de concentração obtidos experimentalmente são bastante inferiores aos valores obtidos através do modelo.

A evolução das curvas de concentração dos açúcares redutores em função do tempo com as cargas de preparado enzimático mais baixas (15 e 25FPU/g_{HC}), obtiveram valores de concentrações de açúcares hidrolisados iguais às que se obtiveram com a maior carga (35FPU/g_{HC}). Sendo assim, não existe qualquer vantagem em gastar mais dinheiro em mais preparado enzimático para converter os polissacáridos em monossacáridos, ou seja, deve usar-se a carga de 15 FPU/g_{HC}.

No gráfico da figura 24 encontra-se a conversão dos açúcares redutores ao longo do tempo do ensaio apresentando, para além dos resultados experimentais, as curvas modelo para cada carga de preparado enzimático.

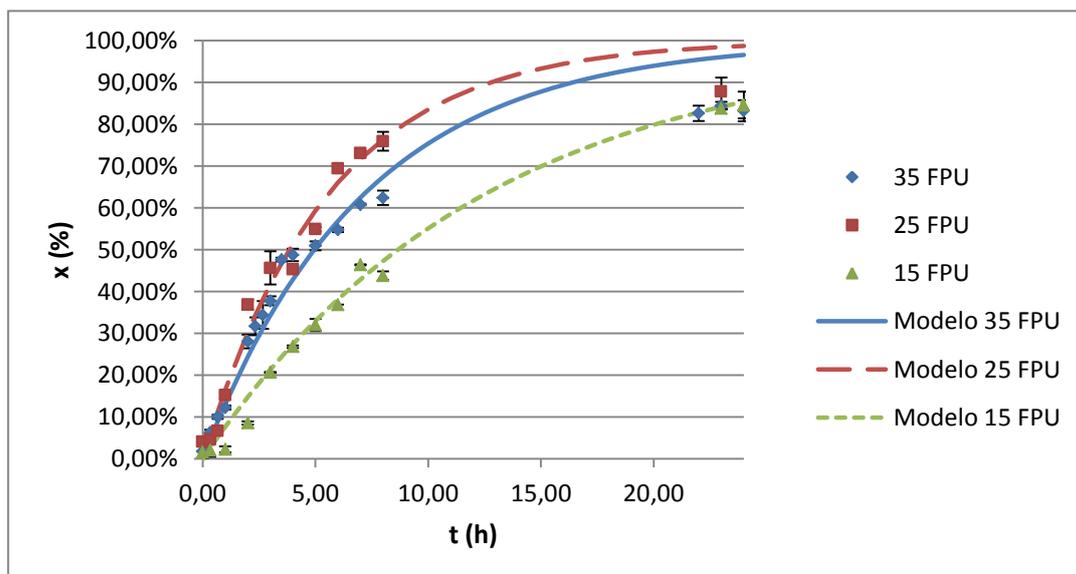


Figura 24 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Serzym 42, com diferentes cargas de preparado enzimático.

O preparado enzimático Serzym 42, era o preparado que apresentava maior atividade enzimática, logo seria de esperar que fosse o preparado com que se obtivesse maior conversão de açúcares redutores ao fim do tempo do ensaio (24 horas). Comparando este preparado com o Cellic Ctec 2 pode-se concluir que não é isso que acontece. Assim como acontece no gráfico da concentração dos açúcares redutores, eram esperadas conversões superiores com as cargas de preparado enzimático de 35 e 25 FPU/g_{HC}.

Por último, utilizou-se o preparado enzimático Novozyme NS-22192, para hidrolisar as pastas kraft cruas. Este preparado era o segundo que apresentava maior atividade enzimática, logo seria de esperar que o preparado enzimático desse resultados idênticos, ou melhores, ao preparado Cellic Ctec 2.

Na figura 25 encontra-se a representação da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo de ensaio, utilizando o método colorimétrico DNS, calculados para cada carga de preparado enzimático. Nas tabelas 20, 21 e 22 do apêndice C encontram-se os resultados utilizados para a construção do gráfico.

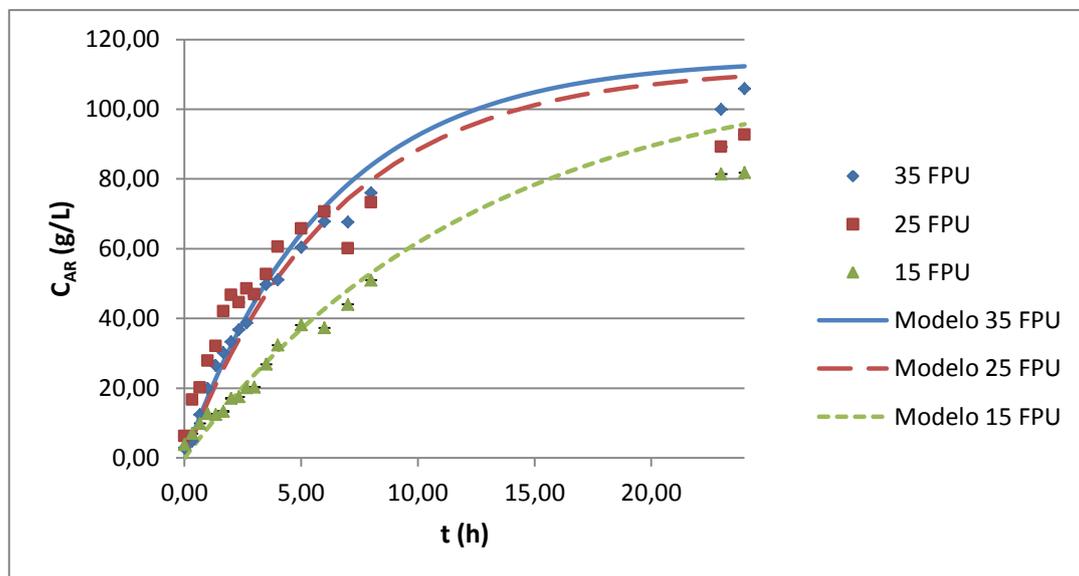


Figura 25 - Concentração de açúcares com a hidrólise enzimática com Novozyme NS-22192, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Aplicando o modelo aos dados experimentais, para o preparado enzimático Novozyme NS-22192, as constantes de velocidade cinética otimizadas foram 0,165, 0,155 e 0,080 h⁻¹ para as cargas de preparado enzimático de 35, 25 e 15 FPU/g_{HC},

respetivamente. Como era de prever, este preparado enzimático juntamente com o preparado Cellic Ctec 2 foram os que obtiveram melhores resultados, assim como, os pontos experimentais das diferentes cargas de preparado deram como era previsto. Os coeficientes de correlação entre o modelo calculado e os pontos experimentais foram 0,993, 0,944 e 0,993 para as cargas de preparado enzimático de 35, 25 e 15 FPU/g_{HC}, respetivamente. O modelo difere um pouco dos pontos obtidos experimentalmente, nos tempos finais de hidrólise. Interpretando o modelo as concentrações obtidas deveriam ser superiores nos tempos finais para as três cargas. Como já referido anteriormente, esse facto pode ser explicado através de uma diminuição da velocidade cinética relacionada com uma limitação por substrato.

Observando o gráfico da figura 25, não existe uma diferença significativa entre a hidrólise com a carga de 35 FPU e a hidrólise com a carga de 25 FPU, logo deve usar-se a carga de preparado enzimático de 25 FPU/g_{HC}.

O gráfico da figura 26 representa a conversão de açúcares redutores ao longo do tempo do ensaio apresentado, para além dos resultados experimentais, as curvas modelo para cada carga de preparado enzimático.

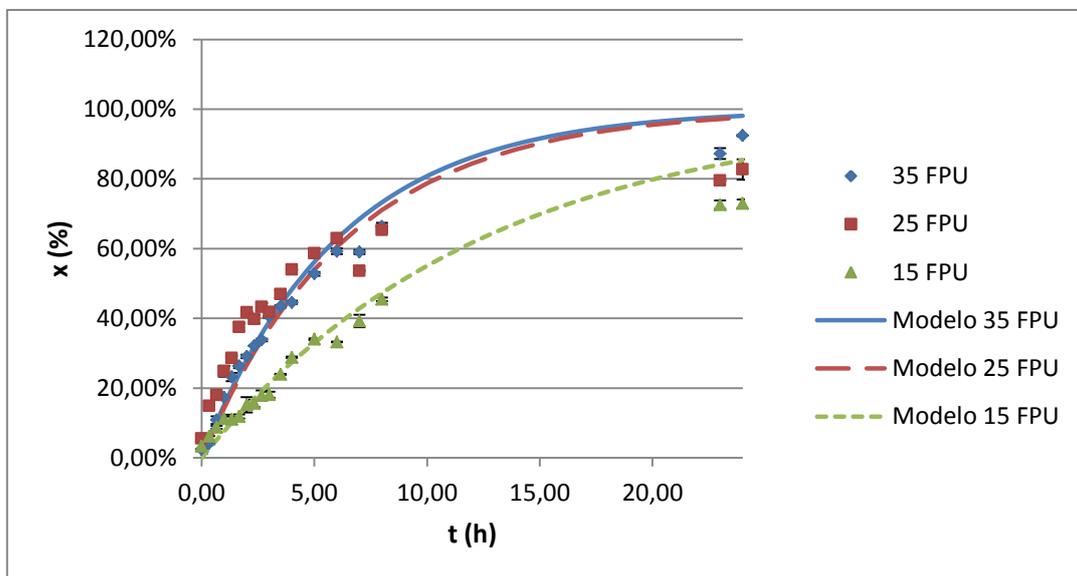


Figura 26 - Conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática com a Novozyme NS-22192, com diferentes cargas de preparado enzimático.

Observando a figura 26 era de esperar que a conversão das cargas de 35 e 25 FPU/g_{HC} fossem superiores às obtidas experimentalmente. Como se pode observar pelas figuras 25 e 26, se o objetivo da hidrólise fosse de 8 horas, tanto a carga de 35 FPU/g_{HC},

como a carga de 25 FPU/g_{HC}, seriam aceitáveis. Apesar da atividade enzimática deste preparado enzimático ser superior à atividade apresentada pelo preparado Cellic Ctec 2, é este último que converte mais os açúcares hidrolisados segundo o método de DNS.

Numa tentativa de se conseguir comparar mais rigorosamente os resultados obtidos, recorreu-se ao cromatógrafo iónico também para o ensaio com o preparado Novozyme NS-22192 e carga de 35FPU/g_{HC}. Na tabela 7 encontram-se os resultados obtidos pelo cromatógrafo iónico para o ensaio em questão.

Tabela 7 - Concentrações de glucose e xilose ao longo do tempo, obtidas através da cromatografia iónica, durante a hidrólise com o preparado Novozyme NS-22192, 35FPU/g_{HC}.

<i>t</i> (h)	<i>FD</i>	<i>C_{Glu}</i> (g/L)	<i>C_{Xil}</i> (g/L)	<i>C_{AR}</i> (g/L)
0	100	1,294	0,5434	1,840
2	1000	28,25	5,426	33,68
4	2000	42,25	8,672	50,92
8	4000	53,00	12,16	65,16
24	4000	92,40	23,57	115,97

No apêndice B encontram-se os exemplos dos espetros obtidos para este ensaio, o espetro das 2 horas, na figura 42, e o espetro das 24 horas, na figura 43.

A concentração teórica deste ensaio calculada através da equação 21 é 114,51g/L. A concentração total de açúcares redutores detetados pelo cromatógrafo iónico às 24h é de 115,97 g/L, logo, a conversão total seria de 101,3%. A concentração teórica deste ensaio é inferior à concentração teórica do ensaio com a Cellic Ctec 2, uma vez que o volume de sólidos é maior na Cellic Ctec 2 do que na Novozyme NS-22192, influenciando o cálculo da concentração teórica como se pode ver pela equação 21. Os 101,3% podem ser interferências de outros açúcares ou componentes existentes nas pastas.

Se em vez do parâmetro 1,11 que se utiliza no cálculo da concentração teórica, equação 21, se utilizasse a proporção de celulose multiplicada por 1,11 e a proporção de xilose multiplicada por 1,14 (parâmetro relativo ao peso da xilose), obter-se-ia um rendimento de conversão de 100,7%, ainda superior ao aceitável mas já no limite. No gráfico apresentado na figura 27, encontra-se uma comparação entre os valores obtidos pelo método DNS e pela cromatografia iónica.

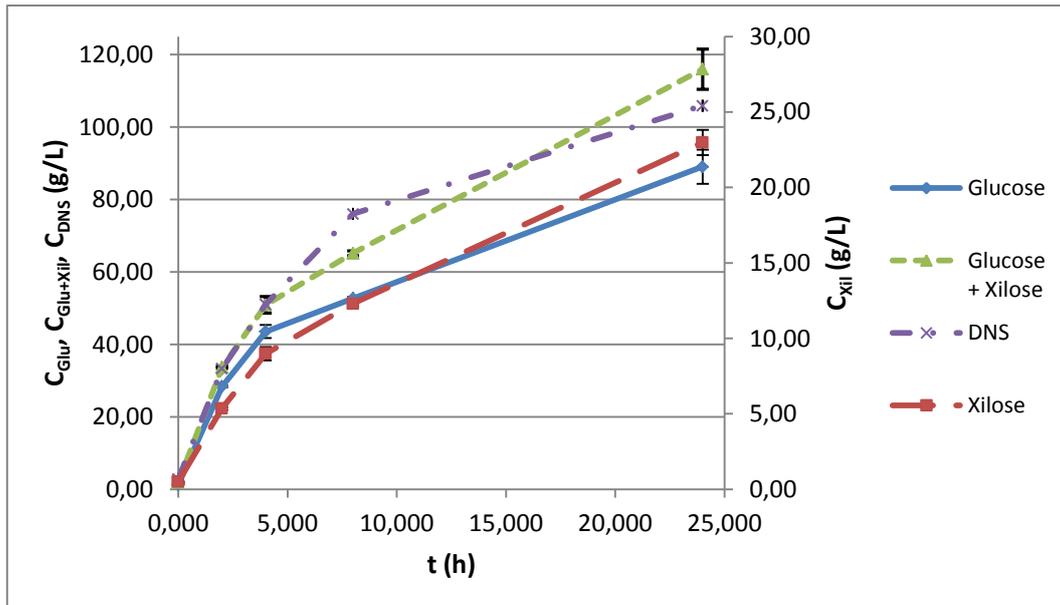


Figura 27 - Comparação de valores entre os métodos DNS e cromatografia iônica.

Observando a figura 27, a concentração de açúcares redutores pelo método de DNS era inferior à concentração de açúcares redutores pelo método de cromatografia iônica. Este resultado não era o esperado, isto porque, como já referido, o DNS deteta e quantifica os açúcares redutores, já a cromatografia iônica apenas deteta e quantifica os monómeros de glucose e xilose, neste caso. Assim, não tem lógica a concentração de açúcares através da cromatografia ser superior à concentração obtida pelo DNS. Tal facto acontece apenas às 24h do ensaio. O desvio padrão da média dos resultados da amostra injetada na cromatografia iônica às 24h é $\pm 5,55\text{g/L}$, ainda assim este desvio não entra na gama de valores obtido pelo método DNS. Um dos motivos para este valor não ser o esperado era o tempo de retenção da xilose estar na gama do tempo de retenção da manose, fazendo com que a concentração de xilose seja superior à realidade. Outro motivo é o valor obtido pelo método DNS estar subvalorizado, devido a interferências experimentais.

O preparado enzimático Cellic Ctec 2 apresentou maior quantidade de xilose e um pouco mais de glucose, sendo assim, este será o preparado enzimático mais adequado para a conversão dos polissacáridos existentes na pasta a monossacáridos suscetíveis a sofrerem uma fermentação para a obtenção de biocombustíveis de segunda geração.

Na aplicação do modelo para cada carga de preparado enzimático, em cada preparado, observou-se uma tendência para a constante cinética diminuir com a diminuição da carga, como já referido. Para além disso, também se observou que os

preparados enzimáticos com menor atividade enzimática eram os que obtinham um menor valor da constante cinética otimizada, com exceção do preparado enzimático Cellic Ctec 2 com que se obteve maiores valores de k .

Na tabela 8 apresentam-se os valores das constantes de velocidade cinética utilizados para cada preparado enzimático, k , assim como a atividade dos preparados, AE , as cargas de preparado, CE , e o valor do coeficiente de correlação entre o modelo e os pontos experimentais, r^2 .

Tabela 8 – Valores das constantes de velocidade cinética otimizadas utilizadas para o modelo, de diferente carga de preparado enzimático e coeficiente de correlação entre o modelo calculado e os pontos experimentais.

Preparado enzimático	AE (FPU/mL _{enzima})	CE (FPU/g _{HC})	k (h ⁻¹)	r^2
Cellic Ctec 2	103,45	35	0,300	0,973
		25	0,250	0,954
		15	0,130	0,984
Celluclast 1,5L	59,480	35	0,060	0,983
		25	0,045	0,978
		15	0,020	0,986
Optimase	38,340	35	0,090	0,947
		25	0,070	0,992
		15	0,050	0,987
Serzym 42	133,50	35	0,140	0,977
		25	0,180	0,976
		15	0,080	0,992
Novozyme NS-22192	133,39	35	0,165	0,993
		25	0,155	0,944
		15	0,080	0,993

3.2.1. Teste de contaminação microbiana

Uma vez que na hidrólise enzimática da pasta kraft crua com a enzima Celluclast 1,5L, obteve-se uma excessiva formação de espuma (Figura 28) com qualquer das 3 cargas enzimáticas, realizou-se um teste de contaminação microbiana ao preparado enzimático referido. Averiguou-se a possibilidade de ter havido uma contaminação do preparado antes da sua utilização.



Figura 28 – Solução final da hidrólise enzimática com a Celluclast 1,5L.

Para a realização do teste de contaminação microbiana partiu-se do princípio que as bactérias e leveduras uma vez semeadas em meio sólido adequado dividem-se num número suficiente de vezes para originar um agregado macroscópico, uma colónia, cultura pura de microrganismos. Sendo assim, células microscópicas originam colónias macroscópicas.

Existem diferentes técnicas de isolamento de bactérias em culturas puras. Neste teste de contaminação foram utilizadas a técnica de sementeira à superfície e a técnica do riscado. Todos os testes foram efetuados em placas Petri com meio LB (Luria-Bertani).

Na técnica de sementeira à superfície as colónias desenvolvem-se apenas à superfície do meio, uma vez que a sementeira é feita em meio sólido (placas de Petri), assim, aplica-se uma alíquota de cultura microbiana líquida sobre a superfície do meio, espalha-se uniformemente com uma vareta de vidro dobrada, de tal maneira que as células bacterianas presentes fiquem uniformemente afastadas umas das outras, e assim após incubação obtêm-se colónias individualizadas (Sinogas, Alho, e Brito, 2003).

A técnica do riscado tem como objetivo produzir colónias bem separadas umas das outras partindo de uma suspensão de células concentradas. A sua execução é bastante

simples, sendo esta uma das técnicas mais utilizadas para isolamento de colónias. As células no início desta técnica encontram-se muito agregadas, mas à medida que o riscado continua cada vez menos células permanecem na ansa, depositando-se cada vez mais afastadas umas das outras no meio de cultura. Uma boa placa de riscado resulta de variados movimentos contínuos e descontínuos, com esterilização à chama e arrefecimento da ansa (Sinogas et al., 2003).

No primeiro teste de contaminação microbiana fizeram-se 7 placas de cultura, onde 4 foram realizadas por sementeira à superfície e 3 em riscado. Estas culturas foram colocadas inicialmente a 37°C durante 48 horas. Não se observou a formação de qualquer tipo de microrganismo e assim diminuiu-se a temperatura de incubação para os 28°C. Apesar da mudança de temperatura não se observou o desenvolvimento de qualquer tipo de microrganismos. Uma das razões encontradas foi a temperatura inicial ser demasiado elevada e quando se baixou esta, já as culturas não conseguiram a formação de qualquer tipo de microrganismo, assim, repetiu-se o teste, desta vez colocando desde o início a temperatura a 28°C.

Com esta temperatura de 28°C, observou-se a formação de colónias de microrganismos, isto é, utilizando 1 mL de preparado enzimático, produziram-se 16 células que originaram 16 colónias, microrganismos unicelulares. Na figura 29 encontra-se uma das placas de cultura realizada em riscado.



Figura 29 – Cultura microbiana com a técnica do riscado onde se desenvolveram microrganismos.

Observando a figura 29, pode concluir-se que o fungo da podridão branca da madeira, “*Trichoderma reesei*”, não é o microrganismo formado neste teste, uma vez que, esse fungo é filamentososo e o seu crescimento seria através de filamentos e não através de colónias puras. Estas colónias observadas na figura 29 têm aspeto brilhante e viscoso, o que pode indicar a possível à formação de um surfatante, daí a presença da espuma nos ensaios com este preparado enzimático.

3.3. Hidrólise enzimática de pasta branqueada

No estudo da hidrólise enzimática da pasta kraft branqueada foi utilizado o preparado enzimático, Novozyme NS-22192 com a carga de preparado de 35 FPU/g_{HC}. Nos gráficos referentes a este estudo, apresenta-se para além da hidrólise da pasta kraft branqueada, a hidrólise da pasta kraft crua utilizando o mesmo preparado enzimático, e a mesma carga do preparado, de maneira comparar resultados.

Na figura 30 encontra-se a representação da concentração de açúcares reductores ao longo do ensaio, utilizando o método colorimétrico, calculados para cada tipo de pasta kraft. Os resultados encontram-se nas tabelas 20 e 26, pasta kraft crua e pasta kraft branqueada, respetivamente, do apêndice C.

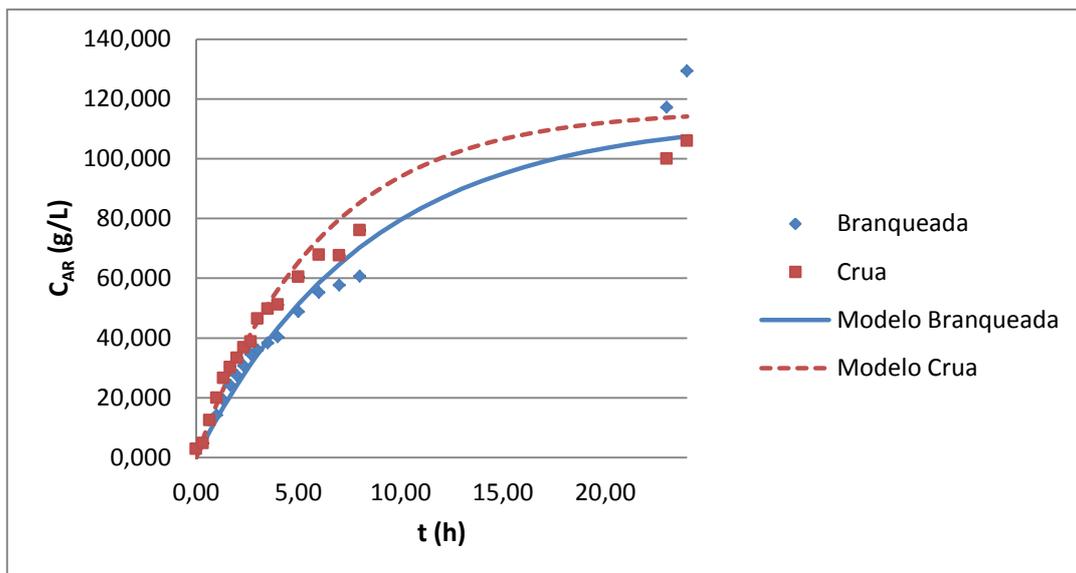


Figura 30 - Concentração de açúcares para a hidrólise enzimática de pastas kraft crua e branqueada com Novozyme NS-22192, com carga de 35 FPU/g_{HC}.

Aplicando o modelo e ajustando aos dados experimentais, as constantes de velocidade cinética otimizadas foram $0,165 \text{ h}^{-1}$ para a pasta kraft crua e $0,120 \text{ h}^{-1}$ para a pasta kraft branqueada.

Como era de esperar a pasta branqueada apresenta uma maior concentração de açúcares redutores no final da hidrólise, isto porque, a própria caracterização das pastas indica que já não existe lenhina nem outros componentes, sendo os únicos componentes os compostos orgânicos, celulose e hemicelulose. Os coeficientes de correlação do modelo ajustado aos pontos experimentais são 0,993 para a pasta kraft crua e 0,957 para a pasta kraft branqueada. Como se pode observar o modelo descreve corretamente a hidrólise da pasta kraft branqueada nos tempos iniciais. Nos tempos finais da hidrólise o modelo não descreve o comportamento da cinética da hidrólise da pasta branqueada, que aumenta a velocidade, daí obterem-se concentrações de açúcares redutores superiores às calculadas através do modelo. A cinética da reação da hidrólise pode alterar-se nos tempos finais do ensaio, fazendo com o modelo já não descreva o comportamento experimental.

Na figura 31 encontra-se a conversão de açúcares hidrolisados ao longo do tempo do ensaio, apresentando para além dos resultados experimentais as curvas modelo, para cada tipo de pasta kraft estudada.

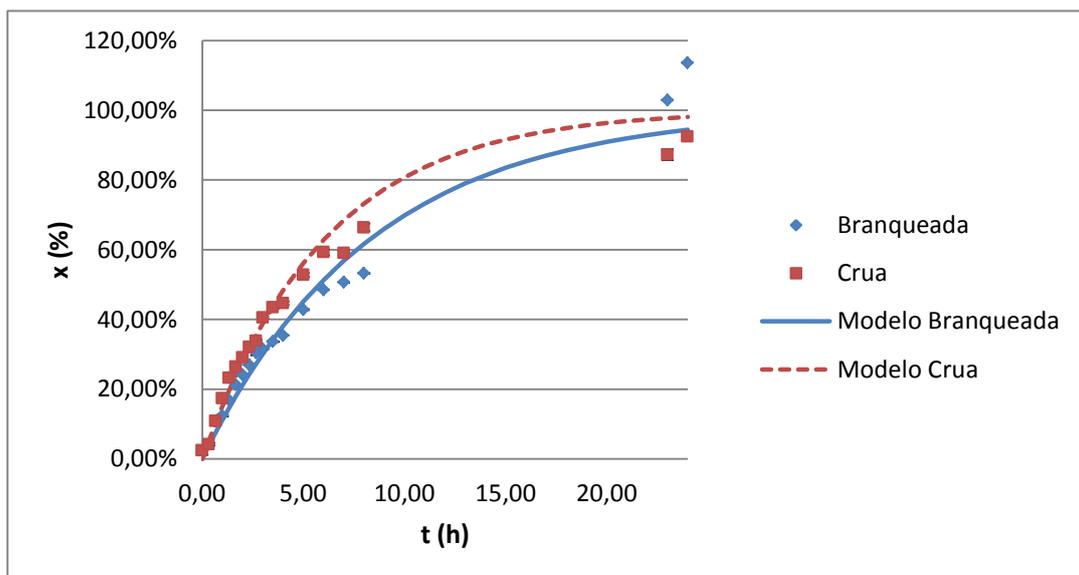


Figura 31 - Conversão de açúcares para a hidrólise enzimática de pastas kraft crua e branqueada com Novozyme NS-22192, com carga de $35 \text{ FPU/g}_{\text{HC}}$.

Os coeficientes de correlação entre o modelo e os dados experimentais já foram apresentados anteriormente. Da mesma forma que o modelo não descreve o comportamento experimental da concentração da pasta branqueada, nos tempos finais do ensaio, também não descreve o comportamento da conversão, como é evidente.

Nos tempos iniciais da hidrólise da pasta branqueada não se conseguiram retirar amostras até à primeira hora, graças ao elevado conteúdo de humidade das pastas branqueadas, o volume de água que se colocou no meio reacional era baixo. Assim, nos instantes iniciais o meio reacional ainda se encontrava bastante sólido, mas durante a primeira hora tornou-se líquido.

Recorreu-se ao cromatógrafo iónico para comprovar os resultados experimentais obtidos para a pasta branqueada. Sendo assim, a tabela 9 apresenta os resultados obtidos pelo cromatógrafo para o estudo da hidrólise da pasta branqueada.

Tabela 9 - Concentrações de glucose e xilose ao longo do tempo, obtidos através da cromatografia iónica, durante a hidrólise da pasta branqueada com o preparado Novozyme NS-22192, 35FPU/g_{HC}.

<i>t</i> (h)	<i>FD</i>	<i>C_{Glu}</i> (g/L)	<i>C_{Xil}</i> (g/L)	<i>C_{AR}</i> (g/L)
1	1000	8,836	1,154	9,990
2	2000	24,26	3,757	28,02
4	4000	44,91	7,762	52,67
8	4000	53,30	9,300	62,60
24	4000	91,20	16,58	107,8

No apêndice B, encontram-se exemplos dos espectros obtidos para este ensaio, o espectro das 2 horas, na figura 44, e o espectro das 24 horas, na figura 45. A concentração teórica deste ensaio, calculada através da equação 16 foi 113,84g/L. A concentração total de açúcares redutores detetados pelo cromatógrafo iónico às 24h foi de 107,8 g/L, logo a conversão total foi de 94,67%. As concentrações de glucose e xilose, na pasta branqueada encontram-se na gama das concentrações na pasta crua. No gráfico apresentado na figura 32, encontra-se uma comparação entre os valores obtidos pelo método DNS e pelo cromatógrafo iónico.

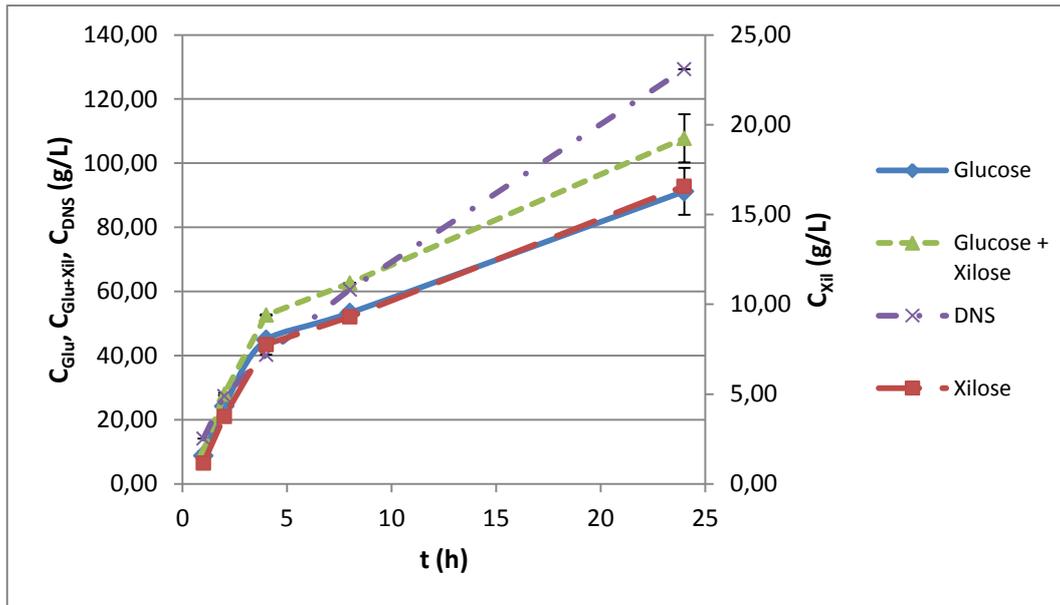


Figura 32 – Comparação de valores entre os métodos DNS e cromatografia iônica.

Como se pode verificar pela figura 32, a curva da glucose com a xilose obtidas através do cromatógrafo é inferior à curva dos açúcares redutores obtida pelo método DNS, o que era esperado.

É de realçar que a pasta branqueada é uma matéria-prima de valor acrescentado, logo não será viável a sua utilização para estes fins, pois o processo de obtenção desta pasta é demasiado dispendioso para esta ser hidrolisada com o objetivo de produzir biocombustíveis de segunda geração.

3.4. Modelo cinético de Michaelis-Menten

Com esta fase do trabalho o objetivo era caracterizar a cinética enzimática do preparado Cellic Ctec 2 com o modelo de Michaelis-Menten recorrendo ao software Matlab. Para isso, usaram-se dois ensaios com concentração de substrato, massa de pasta, inferior à massa pesada durante todos os ensaios. A carga da enzima foi mantida constante.

Utilizaram-se os resultados do ensaio já realizado com a carga 35 FPU/g_{HC} do preparado enzimático da Cellic Ctec 2, com massa de pasta tal qual de 626,4g, massa esta que corresponde aos 100g/L de hidratos de carbono. Nos ensaios que se realizaram posteriormente utilizaram-se as massas de pasta tal qual de 400,0g e 200,0g, correspondendo a uma concentração de hidratos de carbono de 62,58g/L e 31,29g/L,

respetivamente. Esta concentração de hidratos de carbono é calculada através da massa de pasta seca pesada a dividir pelos 2,0L de solução.

Para esta fase foram utilizadas diferentes concentrações de substrato pois, a equação de Michelis-Menten, equação 10, depende diretamente da concentração de substrato, já a concentração de enzima foi mantida constante para se poder comprar os resultados obtidos.

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 10}$$

Na figura 33, encontra-se a representação da concentração de açúcares redutores ao longo do ensaio, utilizando o método colorimétrico DNS, calculados para cada concentração diferente de substrato. Nas tabelas 11, 27 e 28 do apêndice C encontram-se os valores utilizados para a construção deste gráfico.

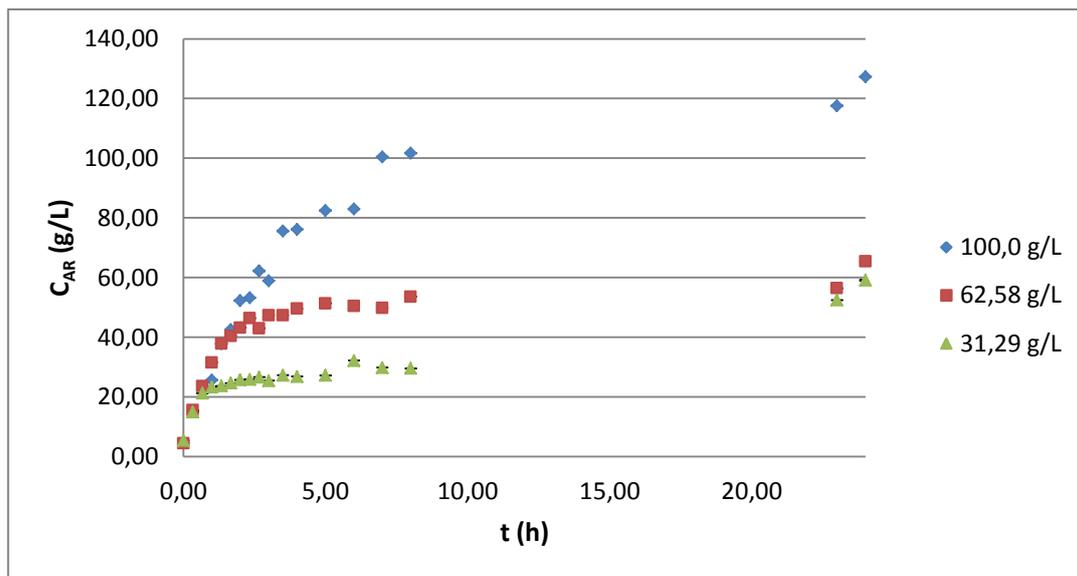


Figura 33 - Concentração de açúcares para a hidrólise enzimática com diferentes concentrações de substrato utilizando o preparado Cellic Ctec 2, com carga de 35 FPU/g_{HC}.

Seguindo o modelo de Michaelis-Menten, a primeira relação a calcular para a estimativa dos parâmetros da equação foi a velocidade inicial de cada um dos ensaios. Observando o gráfico da figura 35, poderia supor-se que as velocidades iniciais eram iguais para todos os ensaios mas, recorrendo ao Matlab, verifica-se que não é esse o caso.

Para iniciar a otimização do modelo de Michaelis-Menten no Matlab é necessário introduzir todos os parâmetros do sistema. Depois de introduzidos, calculou-se as velocidades iniciais de cada ensaio, considerando que a velocidade inicial foi até às 4 horas do ensaio. Essa velocidade inicial é calculada como a derivada da concentração de hidratos de carbono em função do tempo, curvas apresentadas no gráfico da figura 34. Assim, utilizando a função do Matlab “ode45”, obtém-se um vetor de velocidade inicial para cada ensaio. Como o objetivo foi calcular apenas uma velocidade inicial para cada ensaio, fez-se uma média ponderada do vetor sobre o tempo e obtiveram-se os valores de velocidades iniciais que se encontram na tabela 10.

Tabela 10 – Valores das velocidades iniciais para diferentes concentrações de substrato utilizado.

$m_{talqual} (g)$	$[S](g/L)$	$v_0 (g/h)$
626,4	100,0	21,63
400,0	62,58	16,46
200,0	31,29	9,632

Após o cálculo destas velocidades iniciais, utilizou-se uma regressão linear para cálculo dos parâmetros a estimar da equação de Michaelis-Menten, essa regressão linear foi baseada na equação de Lineweaver e Burk que usaram o inverso da equação de Michaelis-Menten. (Cornish-Bowden, 2012; Voet et al., 2002)

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equação 11}$$

Nas figuras 34 e 35 apresentam-se os gráficos obtidos pelo Matlab da velocidade em função da massa de substrato e do inverso da velocidade em função do inverso da massa de substrato, respetivamente.

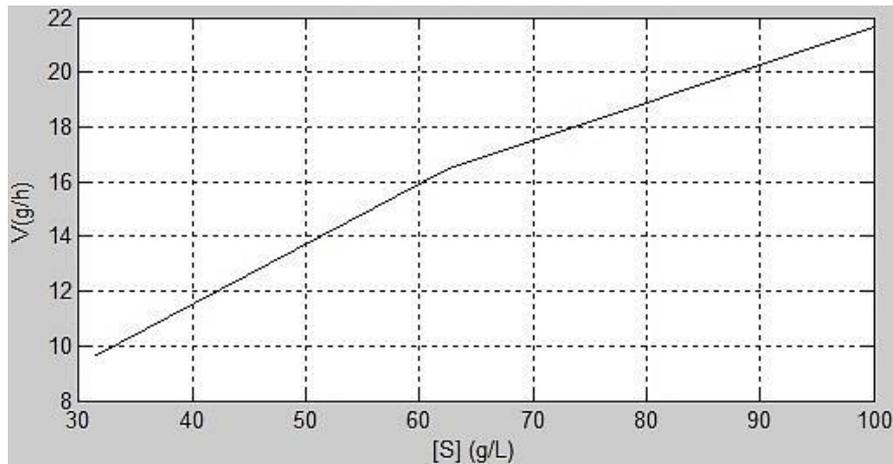


Figura 35 – Efeito das diferentes concentrações de substrato.

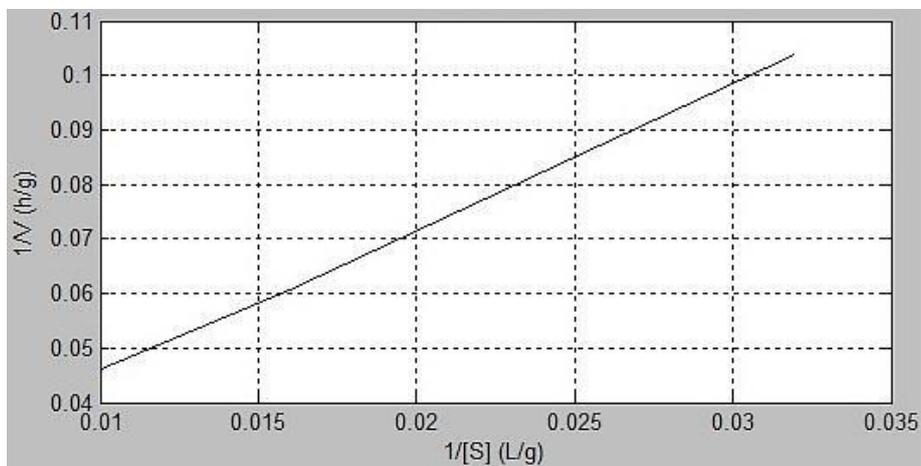


Figura 35 – Aplicação da equação de Lineweaver-Burk, para estimativa dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten.

O valor da constante de Michaelis-Menten obtido, K_m , foi 136,5 g/L e o valor da velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$, foi 51,74 g/h.

O algoritmo que se utilizou no Matlab para a estimativa dos parâmetros e para obtenção dos gráficos encontra-se no Apêndice A. (B. M. Antunes, Cardoso, Silva, e Portugal, 2011)

Após a modelação da equação de Michaelis-Menten no Matlab, resolveu-se utilizar diferentes valores de concentração de substrato para construir uma curva que representa-se a velocidade em função do substrato, mostrando o limite da velocidade máxima e o valor da constante de Michaelis-Menten. Esse gráfico encontra-se na figura 36 e a equação Michaelis-Mente neste caso prático encontra-se na equação 24.

$$v_0 = \frac{51,74 \cdot [S]}{136,5 + [S]}$$

Equação 24

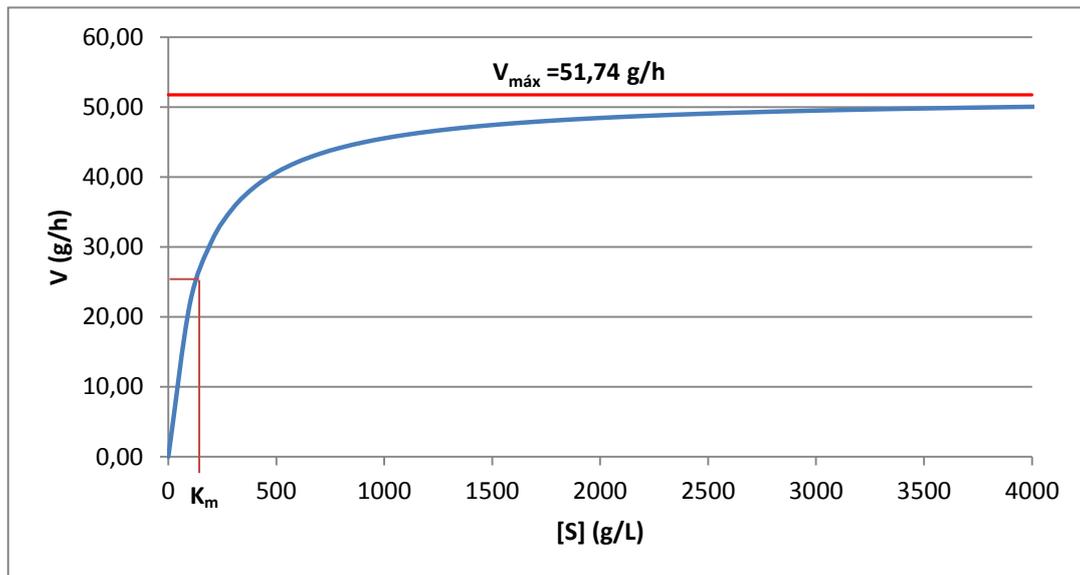


Figura 36 – Cinética enzimática do preparado Cellic Ctec 2.

Como era de prever, o gráfico obtido foi similar ao gráfico encontrado na literatura e que se encontra na seção 1.4.2.1 *Modelo de Michaelis-Menten*, sendo assim admitiu-se que a reação enzimática em estudo seguiu o modelo de Michaelis-Menten, variando a concentração de substrato e mantendo constante a concentração de preparado enzimático.

Graficamente a constante de Michaelis-Menten corresponde à concentração correspondente a metade do valor da velocidade máxima no eixo das concentrações.

Capítulo 4 – Conclusão

Este trabalho teve como objetivo estudar a hidrólise enzimática de pastas kraft cruas e branqueadas do RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e do Papel -com o intuito de converter os polissacáridos existentes na pasta de papel a monossacáridos, suscetíveis a fermentação. Para esse estudo realizaram-se hidrólises modificando a carga de preparado enzimático para 5 diferentes preparados enzimáticos fornecidos.

Nas hidrólises enzimáticas da pasta kraft crua, aplicando o modelo de uma reação cinética de primeira ordem, ajustado aos pontos experimentais para descrever o comportamento das hidrólises, obtiveram-se coeficientes de correlação aceitáveis. Apesar disso, nos tempos finais da hidrólise os ajustes não eram muito corretos, logo pode-se concluir que as hidrólises só são reações cinéticas de primeira ordem nos tempos iniciais da reação. Os preparados enzimáticos que levaram a uma maior conversão de açúcares redutores através da carga de 35 FPU/g_{HC} foram o Cellic Ctec 2, com conversão de 108,3% pelo método de DNS e 99,74% através da cromatografia iônica, e o Novozyme NS-22192, com conversão de 92,47% pelo método de DNS e 101,3% através da cromatografia iônica. Por último, embora a carga de preparado enzimático tenha sido de 25 FPU/g_{HC}, obteve-se com o Serzym 42 uma conversão de 87,79%.

Concluiu-se com os estudos dos diferentes preparados enzimáticos que a carga mais eficiente para hidrolisar as pastas kraft seria 25 FPU/g_{HC}, pois obtêm-se conversões elevadas, e a diferença de preço de uma carga de 25 para uma carga de 35 FPU/g_{HC} é ainda significativa. O preparado enzimático mais eficiente para a hidrólise das pastas kraft cruas é o Cellic Ctec 2.

Durante as hidrólises enzimáticas observou-se a formação de espuma em todos os ensaios, mas com o preparado enzimático Celluclast 1,5L, a formação da espuma foi demasiada assim, realizou-se um teste de contaminação microbiana. Com esse teste observou-se a formação de colónias puras de microrganismos, indicando que existia uma contaminação microbiana.

No decorrer deste trabalho foi realizada uma hidrólise enzimática com a pasta kraft branqueada. Esse ensaio atingiu concentrações de açúcares redutores superiores, uma vez que na caracterização destas pastas, apenas existem compostos orgânicos. A utilização destas pastas para obtenção de monossacáridos suscetíveis a serem

fermentados não é viável, pois as pastas sofrem para além do cozimento o processo de branqueamento tornando-se demasiado dispendiosas para serem utilizadas para esse fim.

Para terminar este trabalho foram feitos ensaios de hidrólise enzimática com diferentes concentrações de substrato, para se conseguir modelar os resultados com o modelo de Michaelis-Menten utilizando o software Matlab. Assim manteve-se constante a concentração de preparado enzimático Cellic Ctec 2. As concentrações de substrato utilizadas foram 100,0g/L, 62,58g/L e 31,29g/L. Estimaram-se os parâmetros característicos do modelo cinético, nomeadamente a constante de Michaelis-Menten cujo valor foi 136,5 g/L e a velocidade máxima cujo valor apresentado foi 51,74 g/h.

Referências Bibliográficas

- Adney, B., e Baker, J. (2008). Measurement of Cellulase Activities. *National Renewable Energy Laboratory*, (January).
- Almeida, P. C. O. R. (2006). *Estudo da influência da temperatura e do tempo de prensagem nas características físico mecânicas , de diferentes tipos de MDF aquando do seu revestimento por prensagem*. Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais Lenhocelulósicos, Universidade Técnica de Lisboa.
- Antunes, B. M., Cardoso, S. P., Silva, C. M., e Portugal, I. (2011). Kinetics of Ethyl Acetate Synthesis Catalyzed by Acidic Resins. *Chemical Education*, 88, 1178–1181. doi:10.1021
- Antunes, R. (2010). Utilização de algas para a produção de biocombustíveis. *INPI - Instituto Nacional Da Propriedade Industrial*.
- Béguin, P., e Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 25–58.
- Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., e Gama, M. (2003). *Engenharia enzimática* (p 250). Lidel.
- Celpa. (2013). A importância do setor da pasta e do papel - Economia. Obtido de <http://www.celpa.pt>
- Clarke, A. J. (1996). *Biodegradation of Cellulose: Enzymology and Biotechnology*. Obtido de <http://www.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=iBFI9XGktAsC&pgis=1>
- Coelho, M. A., Salgado, A. M., e Ribeiro, B. D. (2008). *Tecnologia Enzimática* (p 288). Editora EPUB.
- Coimbra, U. de. (2007). Portal de Engenharia Química. *Faculdade de ciências e tecnologia*. Obtido de http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=96&Itemid=201#5
- Cornish-Bowden, A. (2012). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. (Wiley-Blackwell, Ed) (4ª Edição.). Marselha: Ebooks Chemical Engineering.
- Damaso, M. C. T., Farinas, C. S., e Salum, T. F. C. (2012). Produção e imobilização de enzimas aplicadas à produção de etanol e biodiesel. *Microrganismos Na Produção de Biocombustíveis Líquidos*, 101–125. Obtido de <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/965933>
- Fengel, D., e Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. (p 450). De Gruyter.

- Ferreira, A. R. F. C. (2010). *Efeito do tratamento hiperbárico na hidrólise de pasta kraft com celulase*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Universidade de Aveiro.
- Gailing, M. F., Guibert, A., e Combes, D. (1998). Sensitive and reproducible method for neutral monosaccharides and uronic acid determination in sugar beet pulp enzymatic treatment media and press juices by High Performance Anion Exchange Chromatography with pulsed amperometric detection. *Biotechnology Techniques*, 12(2), 165–169. doi:10.1023/A:1008852920291
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 59(Cellulase), 257–268.
- Henriksson, G., Ek, M., e Gellerstedt, G. (2009). *Pulp and Paper Chemistry and Technology - Volume 1 - Wood Chemistry and Biotechnology* (p 1600). Walter de Gruyter & Company. Obtido de <http://books.google.com/books?id=lsHPnQEACAAJ&pgis=1>
- Hill, C. A. S. (2007). *Wood Modification: Chemical, Thermal and Other Processes* (Google eBook) (p 260). John Wiley & Sons.
- ICNF. (2013). Instituto de Conservação da Natureza e da Floresta. *IFN6 - Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental em 1995, 2005 e 2010*. Obtido de <http://www.icnf.pt>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(III), 426–428.
- Novozymes. (2012). Celluclast 1,5L - Product Data Sheet. Dinamarca.
- Paulová, L., Patáková, P., Rychtera, M., e Melzoch, K. (2013). Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques. Em *Production of 2nd Generation of Liquid Biofuels* (Vol Chapter 2, pp 47–78).
- Pontes, A. S. N. (2008). *Bioprocessamento de pentoses do licor de cozimento ao sulfito ácido*. Departamento de Química, Universidade de Aveiro. Tese de Mestrado em Materiais derivados de recursos renováveis, Universidade de Aveiro.
- Portucel-Soporcel. (2013). Perfil da empresa. Obtido de <http://www.portucelsoporcel.com>
- Reese, E. T., Siu, R. G. H., e Levinson, H. S. (1950). The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and its relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis. *Carboxymethyl Cellulose*, 59, 485–497.
- Ricardo, C. P., e Teixeira, A. (1983). *Enzimas* (4^o edição.). Amadora: Didática Editora.
- Rowell, R. M., e Levan-Green, S. (2005). Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. Em R. M. Rowell (Ed), *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites* (pp 128–145). Taylor & Francis.

- Scopes, R. K. (2002). Enzyme Activity and Assays. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6.
- Sinogas, C., Alho, L., e Brito, I. (2003). *Princípios de microbiologia - Textos de apoio e Manual prático* (Universida., p 73). Évora.
- Sixta, H. (2006). *Handbook of Pulp, Volume 1* (p 1348). Wiley.
- Sjöström, E. (1993). *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*.
- Smook, G. A. (2002). *Handbook for Pulp and Paper Technologists* (p 425). Angus Wilde Publications Incorporated.
- Voet, D., Voet, J. G., e Pratt, C. W. (2002). *Fundamentals of Biochemistry* (p 1056). USA: Wiley. Obtido de <http://books.google.com/books?id=XS5NngEACAAJ&pgis=1>
- Wang, L., Sharifzadeh, M., Templer, R., e Murphy, R. J. (2013). Bioethanol production from various waste papers: Economic feasibility and sensitivity analysis. *Applied Energy*, 111, 1172–1182. doi:10.1016/j.apenergy.2012.08.048
- Wyman, C. E., Decker, S. R., Himmel, M. E., Brady, J. W., e Skopec, C. E. (2005). Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. Em S. Dumitriu (Ed), *Polysaccharides - Structural Diversity and Functional Versatility* (2º Edição.). doi:10.1201/9781420030822.ch43
- Zhang, Y. H. P., Hong, J., e Ye, X. (2009). Cellulase Assays. *Biofuels: Methods and Protocols*, 581(Methods in Molecular Biology), 213–31. doi:10.1007/978-1-60761-214-8_14

Apêndices

Apêndice A – Exemplos de Cálculo

1. Cálculo das atividades

Este exemplo de cálculo segue as normas da IUPAC, em função dos ensaios de atividade enzimática (Adney e Baker, 2008). A equação seguinte é em função da atividade enzimática, AE , da quantidade de preparado enzimático em cada diluição, mL_{enzima} , o volume da solução utilizada, $mL_{solução}$. Para se determinar o denominador desta equação é necessário encontrar duas diluições de preparado enzimático que permitam libertar um pouco mais e um pouco menos que 2 mg de glucose (Scopes, 2002).

$$AE \left(\frac{FPU}{mL_{enzima}} \right) = \frac{0,37}{mL_{enzima} / mL_{solução} \text{ para libertar } 2mg \text{ de glucose}}$$

Com estes dois pontos, constrói-se uma curva que represente a massa de glucose libertada em função do quociente entre os volumes de preparado enzimático e de solução. Com a equação desta representação, nomeadamente com os valores do seu declive e da sua ordenada na origem será possível determinar o parâmetro desejado.

$$mL_{enzima} / mL_{solução} \text{ para libertar } 2mg \text{ de glucose} = \frac{(2 - b)}{m}$$

$$m_{Glu} = m \times mL_{enzima} / mL_{solução} + b$$

$$m_{Glu} = C_{Glu} \times V_{amostra}$$

$$C_{Glu} = m \times Abs_{média} + b$$

Equação da curva de calibração da glucose

$$mL_{enzima} / mL_{solução} = \frac{1}{FD_{enzima}}$$

2. Cálculo das massas de pasta

Este exemplo de cálculo é igual para todas os preparados enzimáticos assim como para todas os ensaios realizados, a diferença é na caracterização das pastas.

$$m_{seca}(g) = V_{solução} \times C_{HC} = 2,0 \times 100 = 200,0 \text{ g}$$

$$m_{HC}(g) = m_{seca} \times \text{Orgânicos}$$

$$m_{talqual}(g) = \frac{m_{seca}}{1 - H}$$

Depois de se obter o valor da massa de pasta de papel a utilizar calcula-se o volume de preparado enzimático a colocar num balão de 200 mL, através da carga preparado enzimático, carga de preparado enzimático por hidratos de carbono e atividade enzimática.

$$CZ (FPU) = CE \times m_{HC}$$

$$V_E(mL) = \frac{CZ}{AE}$$

Por último o volume de água a introduzir na pasta para perfazer os 2,0 L de solução é calculada com base no volume da solução, volume da solução de preparado enzimático (200 mL) e no volume da amostra de água já inserida nas pastas.

$$V_{amostra}(mL) = m_{talqual} - m_{seca}$$

$$V_{água}(L) = V_{solução} - (V_{amostra} + V_{SE}) \times 1 \cdot 10^{-3}$$

3. Correção dos valores obtidos durante a hidrólise

Devido à elevada taxa de evaporação observada durante as hidrólises, foi necessário recorrer a correções dos valores para a concentração de açúcares e para a conversão destes.

$$m_{AR}(g) = C_{AR} \times V_{filtrado}$$

$$m_{AR_c}(g) = m_{AR} \times \frac{V_{filtrado}}{V_{solução} - V_{sólidos}}$$

Para se calcular a concentração corrigida, é necessário entrar com uma função linear da evaporação em função do volume e do tempo, $f(t, V)$, uma vez que esta não é igual para todos os tempos.

$$C_{AR_c}(g/L) = \frac{m_{AR_c}}{f(t, V)}$$

De seguida calcula-se os valores de conversão para os açúcares, sendo que é necessário recorrer a uma concentração teórica que altera de preparado enzimático para preparado enzimático assim como de carga de enzima para carga de preparado enzimático.

$$C_T(g/L) = \frac{2 \times C_{pasta} \times Organicos \times 1,11}{V_{solução} - V_{sólidos}}$$

$$x(\%) = \frac{C_{AR_c}}{C_T}$$

4. Desenvolvimento da integração da equação modelo

A equação da concentração modelo de açúcares redutores e a conversão modelo dos mesmos é desenvolvida partindo da equação cinética de primeira ordem.



$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k[S]$$

Supõe-se que o substrato é consumido segundo a equação, $[S] = [S]_0(1 - x)$. Assim igualando as equações de consumo de substrato e integrando em ordem à conversão modelo dos açúcares redutores, obtêm-se as seguintes igualdades.

$$\begin{aligned} -\frac{d[S]}{dt} &= k[S] \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow -[S]_0 \frac{d(1-x)}{dt} &= k[S]_0(1-x) \Leftrightarrow \end{aligned}$$

$$\Leftrightarrow \int_0^{x_M} \frac{dx}{(1-x)} = \int_0^t k \cdot dt \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow -\ln(1-x_M) = k \cdot t \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow 1-x_M = e^{-kt} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow x_M = 1 - e^{-kt}$$

A equação da concentração modelo dos açúcares redutores é obtida através da multiplicação da conversão modelo com a concentração teórica de cada ensaio.

$$x_M = \frac{C_M}{C_T} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow C_M = C_T \cdot x_M \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow C_M = C_T [1 - e^{-kt}]$$

5. Algoritmo utilizado no Software Matlab

% Estimação dos parâmetros de Michelis-Menten, com a mesma concentração de enzima mas diferente concentração de pasta (substrato)

clc

close all

clear all

% Colocar os dados experimentais

n=1; % número de experiências

S1=100.0; % (g)

S2=62.58; % (g)

S3=31.29; % (g)

t=[0.00 0.33 0.67 1.00 1.33 1.67 2.00 2.33 2.67 3.00 3.50 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 23.00 24.00];

%tempo de reação, h

ti=t(1:12);

c1=[3.300 5.874 9.912 25.670 37.802 42.503 52.307 53.247 62.201 58.951 75.605 76.142
82.499 82.947 100.438 101.669 117.561 127.299]; %Concentração corrigida (g/L)

c2=[4.521 15.543 23.650 31.573 37.892 40.440 43.226 46.404 43.021 47.407 47.402 49.576
51.368 50.432 49.792 53.590 56.436 65.430]; %Concentração corrigida (g/L)

```
c3=[5.426 14.972 21.213 23.313 23.688 24.677 25.751 25.889 26.632 25.439 27.267 26.836
27.235 32.193 29.829 29.560 52.473 59.132]; %Concentração corrigida (g/L)
```

```
ci1=c1(1:12);
```

```
ci2=c2(1:12);
```

```
ci3=c3(1:12);
```

%Cálculo das velocidades iniciais para cada ensaio

```
[t2,cc1]=ode45(@inivel,ti,ci1);
```

```
for b=(1:length(cc1))
```

```
    cc4(1,b)=cc1(1,b);
```

```
end
```

```
v01=mean(cc4/t2');
```

```
[t2,cc2]=ode45(@inivel,ti,ci2);
```

```
for b=(1:length(cc2))
```

```
    cc5(1,b)=cc2(1,b);
```

```
end
```

```
v02=mean(cc5/t2');
```

```
[t2,cc3]=ode45(@inivel,ti,ci3);
```

```
for b=(1:length(cc3))
```

```
    cc6(1,b)=cc3(1,b);
```

```
end
```

```
v03=mean(cc6/t2');
```

%Cálculo de Km e Vmáx através da equação de Michaelis-Menten

```
V0=[v01,v02,v03];
```

```
S=[S1,S2,S3];
```

```
[R,M,B]=regression(1./S,1./V0);
```

```
Vmax=1/B;
```

```
Km=M/B;
```

% Gráficos

```
subplot (221);plot (S,V0);
```

```
xlabel('[S] (g/L)');ylabel ('V(g/h)');
```

```
grid on;title ('Efeito das concentrações de substrato');
```

```
subplot (222);plot (1./S,1./V0);  
xlabel('1/[S] (L/g)');ylabel ('1/V (h/g)');  
grid on;title ('Lineweaver-Burk');
```

% A função veloc é definida da seguinte maneira

```
function v0=veloc(tt,substrato,Km,Vmax)
```

% Sistema de equações diferenciais equação de michaelis menten

```
v0=(Vmax.*substrato)/(Km+substrato);
```

```
end
```

% A função inivel é definida da seguinte maneira

```
function v0=inivel(ti,ci)
```

```
v0=ci./ti';
```

```
end
```

Apêndice B – Figuras Auxiliares

Neste apêndice apresentam-se as figuras auxiliares que ajudaram a escrever este trabalho, assim como ajudaram à sua compreensão. Na figura 37 e 38 encontram-se as reações de peeling e stopping dos polissacarídeos na madeira.

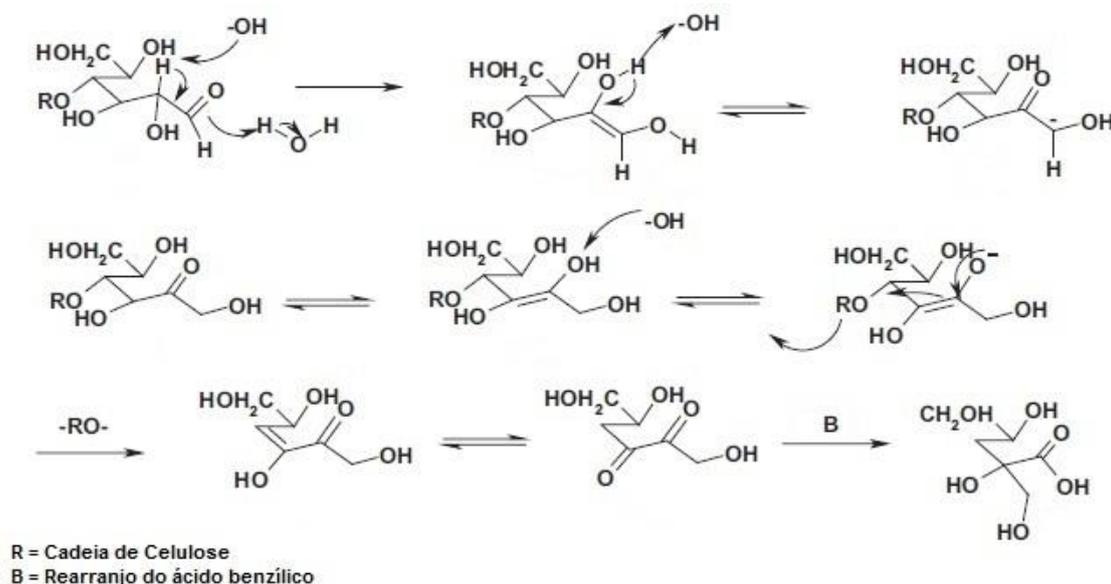


Figura 37 – Reação de Peeling dos polissacarídeos. Adaptado de (Sixta, 2006).

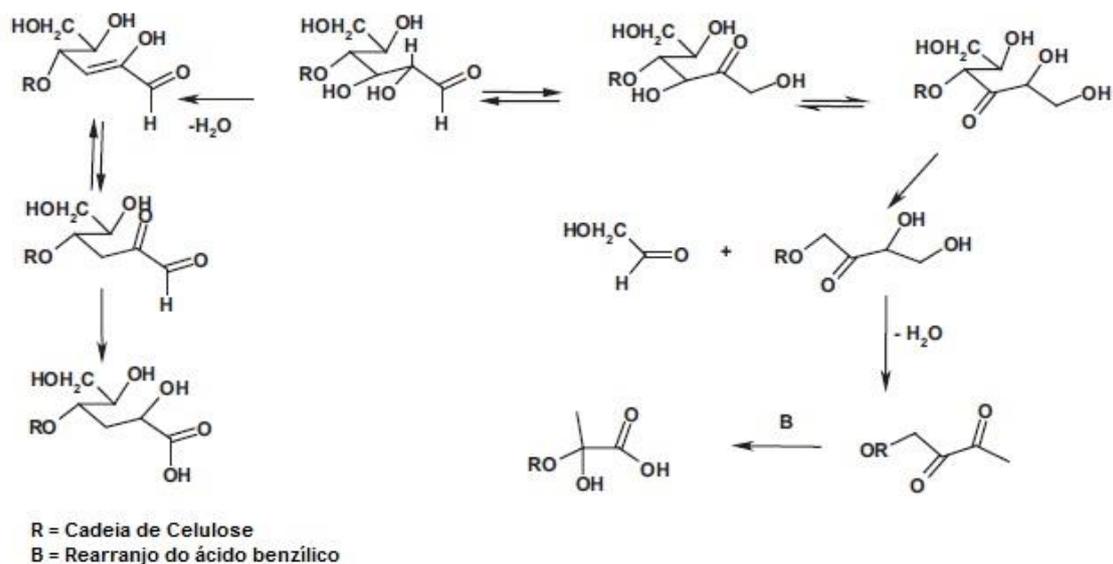


Figura 38 – Reação de Stopping dos polissacarídeos. Adaptado de (Sixta, 2006).

Na figura 39 encontra-se a curva de calibração da glucose utilizada nos cálculos das concentrações dos açúcares durante a hidrólise.

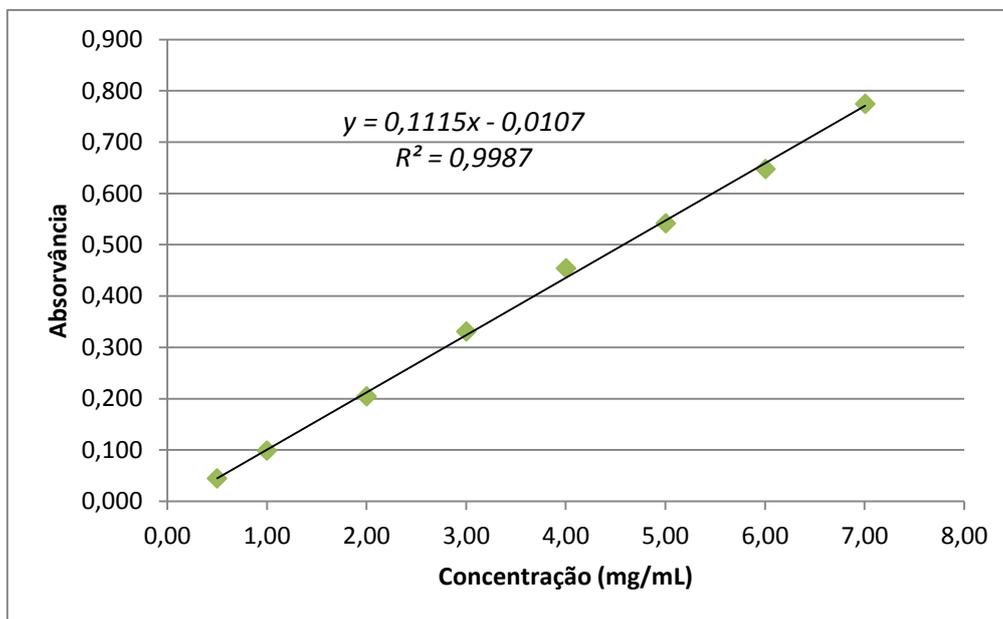


Figura 39 – Curva de calibração da glucose pelo método DNS.

De seguida apresentam-se exemplos dos espectros obtidos pela cromatografia iónica.

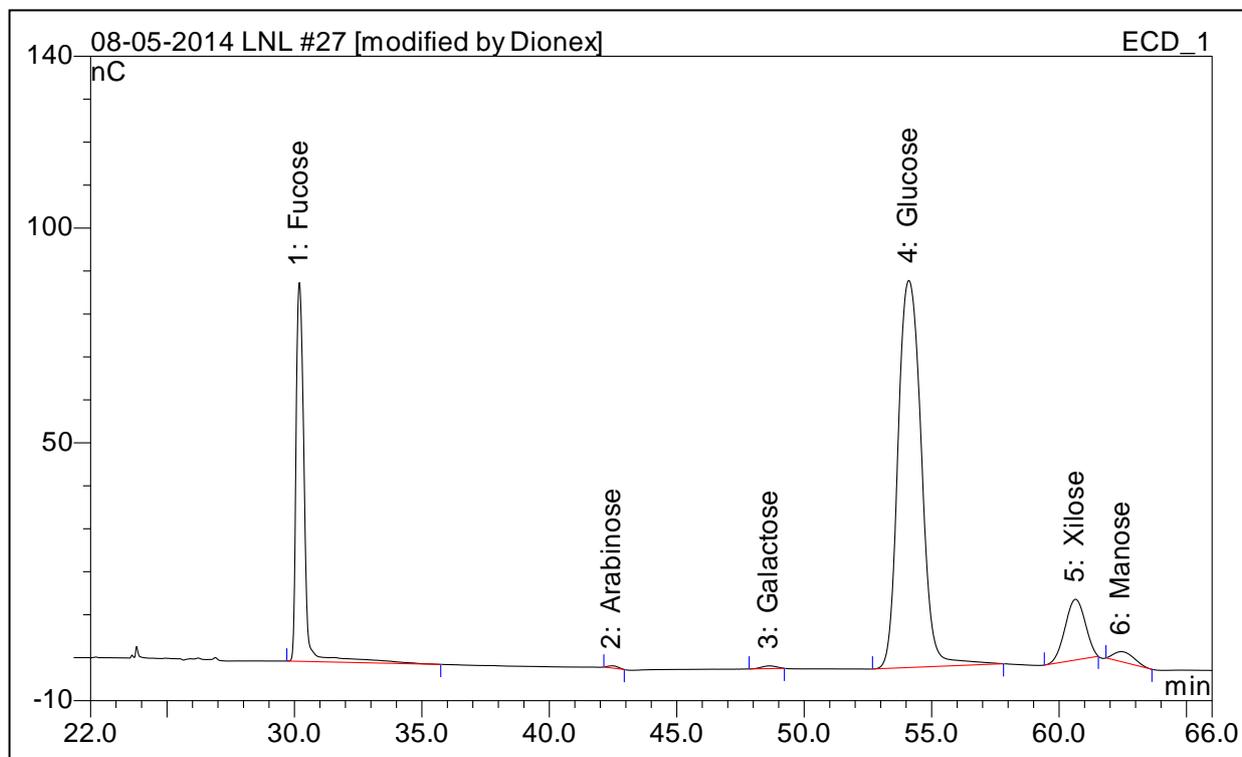


Figura 40 – Espectro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 2 horas com o preparado enzimático Cellic Ctec 2, 35 FPU/gHC.

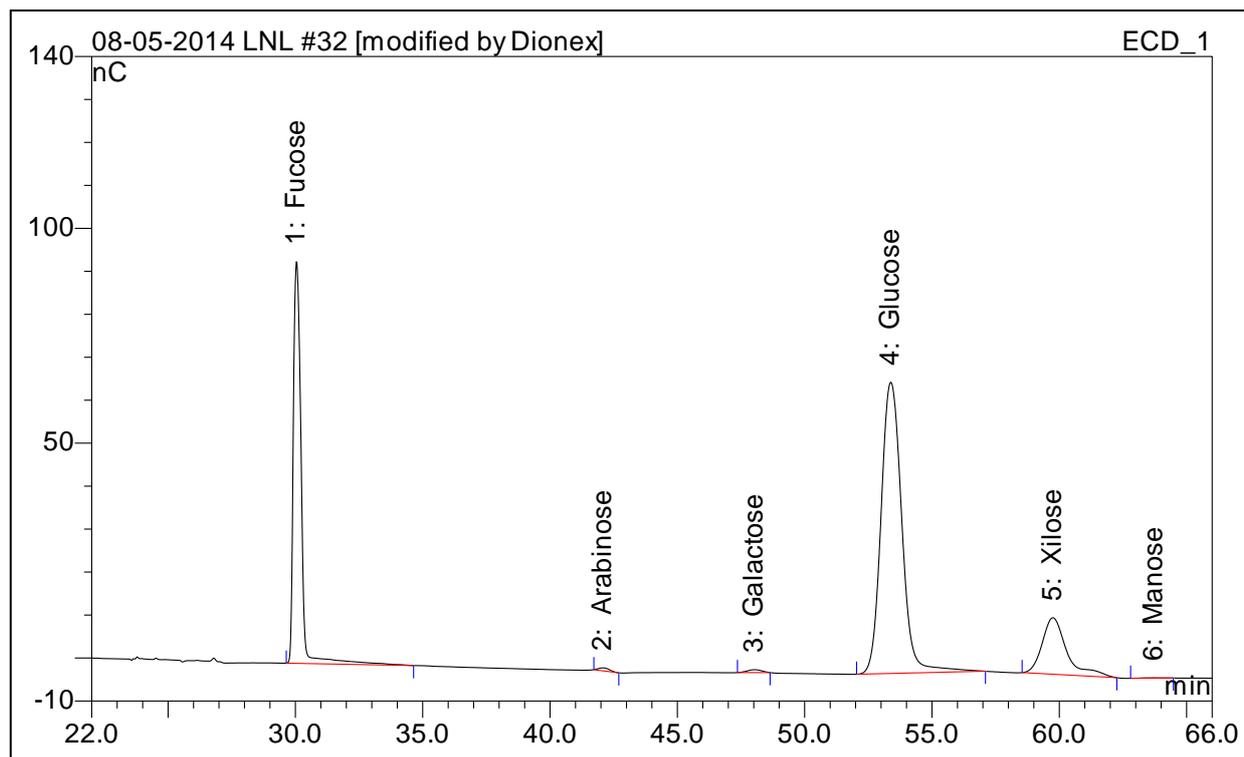


Figura 41 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 24 horas com o preparado enzimático Cellic Ctec 2, 35 FPU/g_{HC}.

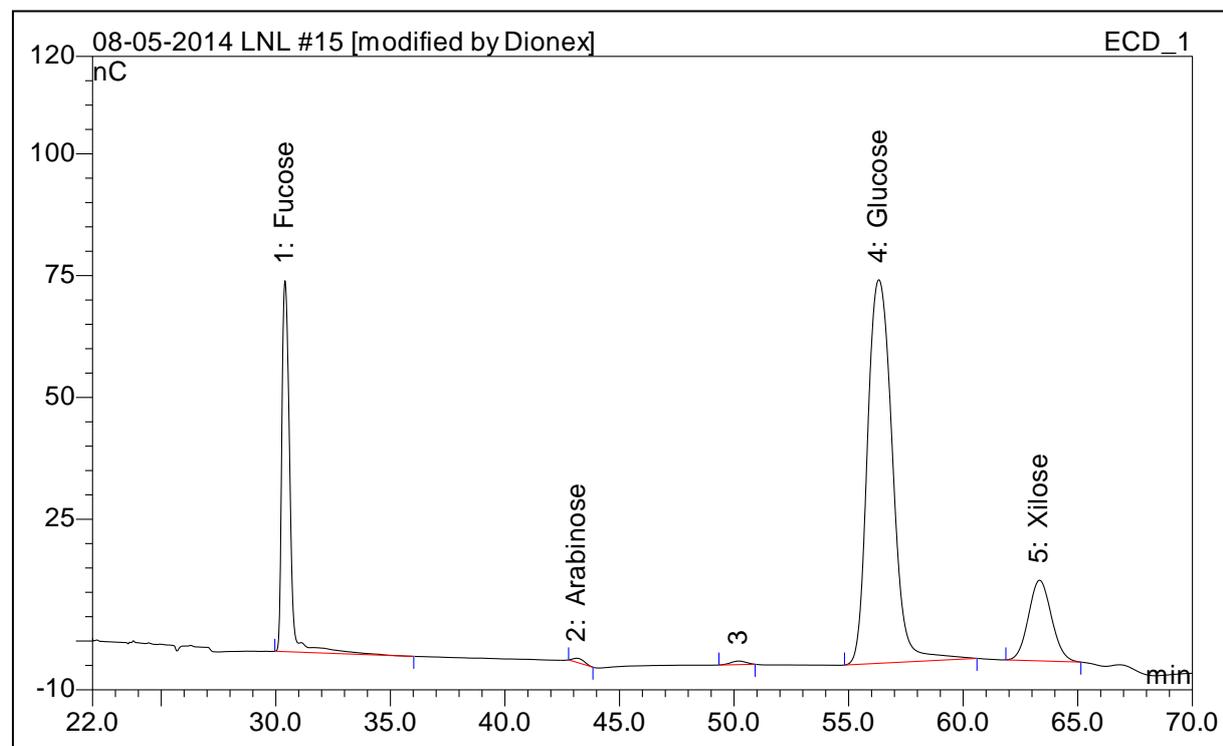


Figura 42 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 2 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g_{HC}.

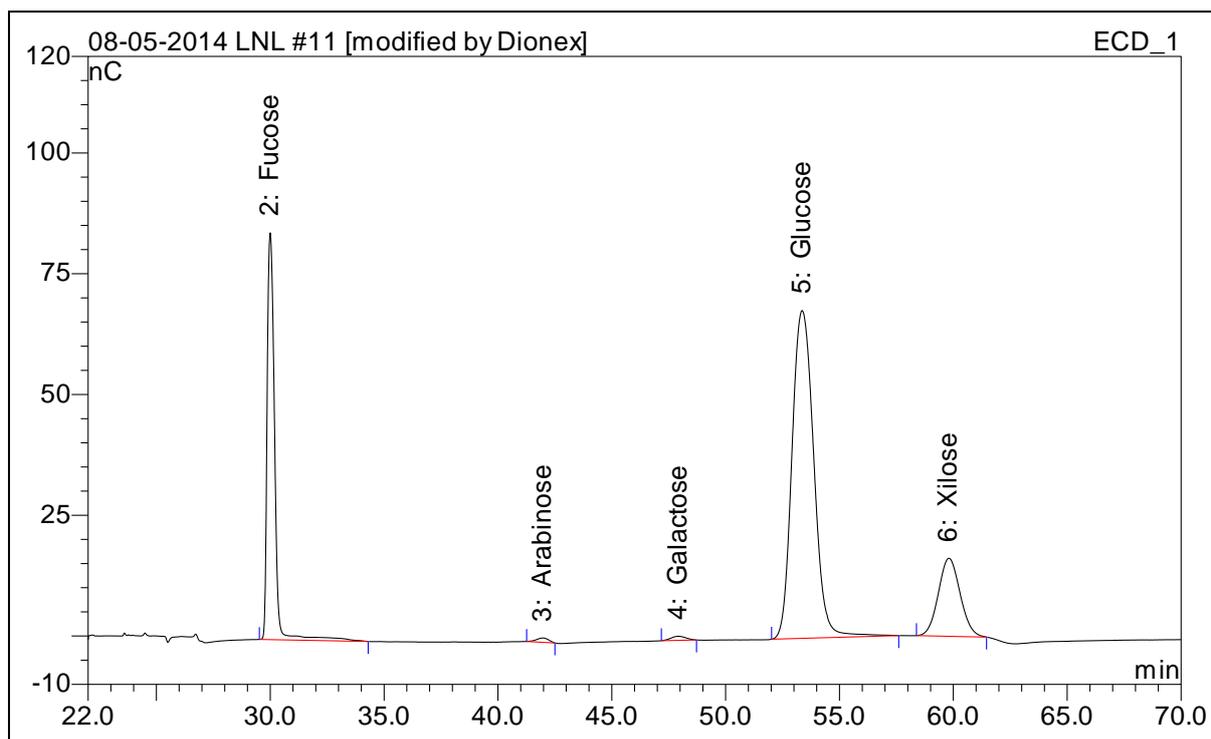


Figura 43 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise às 24 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g_{HC}.

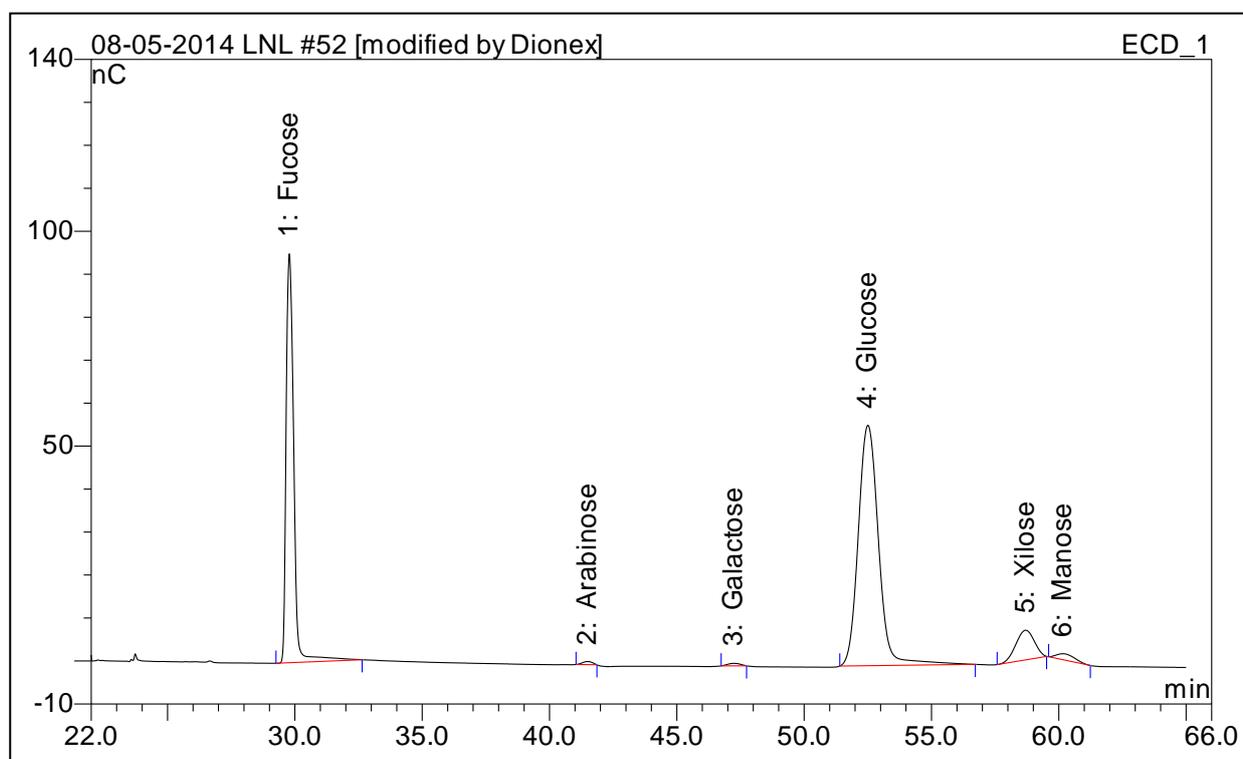


Figura 44 - Espetro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise das pastas branqueada às 2 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g_{HC}.

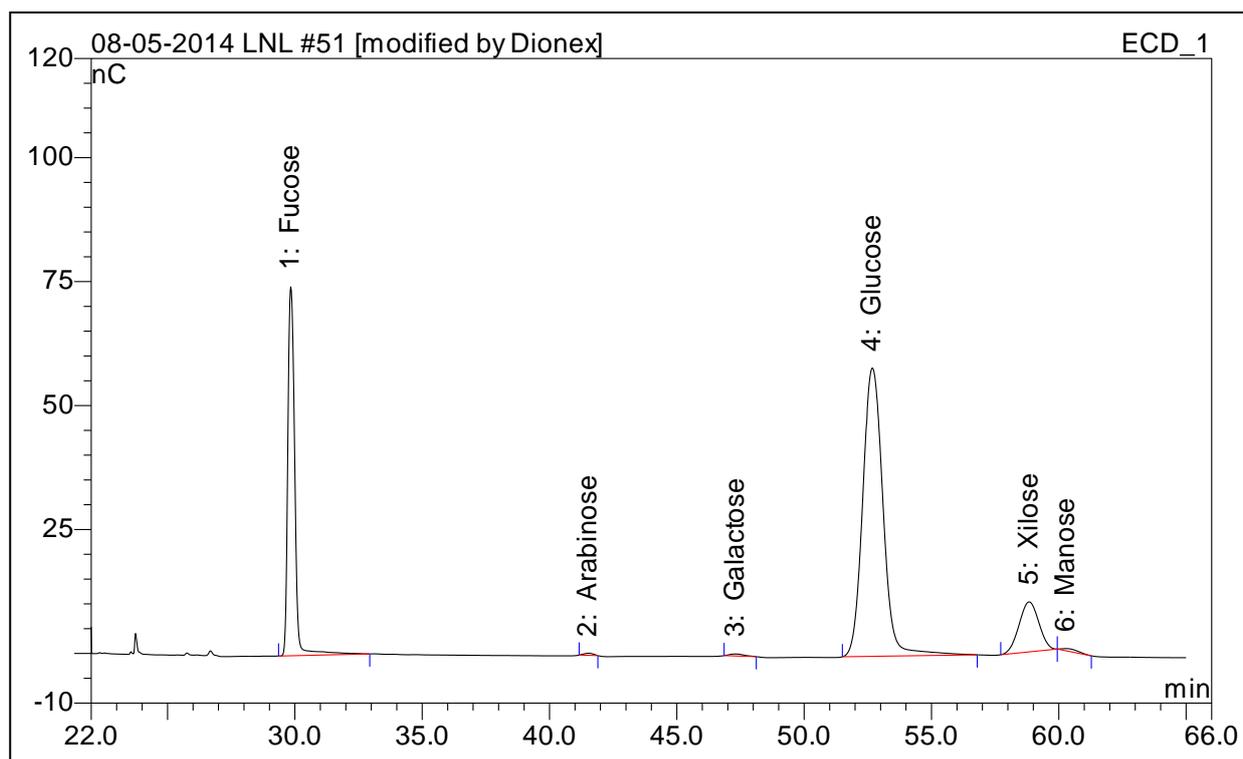


Figura 45 - Espectro obtido pelo cromatógrafo para o ensaio de hidrólise das pastas branqueada às 24 horas com o preparado enzimático Novozyme NS-22192, 35 FPU/g_{HC}.

Apêndice C – Tabelas Auxiliares

As tabelas apresentadas neste apêndice foram utilizadas nos gráficos construídos para todos os ensaios de hidrólises enzimáticas.

Tabela 11 – Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Cellic Ctec 2, 35 FPU/g_{HC}.

t (h)	C_{AR} (g/L)	m_{AR} (g)	m_{AR_C} (g)	C_{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	3,300	6,104	6,104	3,2995	2,81%
0,33	5,874	10,866	10,866	5,8737	4,99%
0,67	9,912	18,337	18,337	9,9119	8,43%
1,00	25,670	47,490	47,490	25,6702	21,83%
1,33	37,802	69,934	69,934	37,8024	32,14%
1,67	42,503	78,631	78,631	42,5030	36,14%
2,00	52,307	96,768	96,768	52,3072	44,48%
2,33	53,247	98,508	98,508	53,2473	45,28%
2,67	62,201	115,072	115,072	62,2010	52,89%
3,00	58,951	109,059	109,059	58,9510	50,13%
3,50	75,605	139,869	139,869	75,6047	64,29%
4,00	76,142	140,863	140,863	76,1419	64,75%
5,00	82,499	152,623	152,623	82,4990	70,15%
6,00	82,947	153,451	153,451	82,9467	70,53%
7,00	100,438	185,810	185,810	100,4377	85,41%
8,00	101,669	188,087	188,087	101,6688	86,45%
23,0	117,561	217,489	217,489	117,5615	99,97%
24,0	127,299	235,502	235,502	127,2985	108,25%

Tabela 12 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Cellic Ctec 2, 25 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	8,48	16,280	16,280	8,479	7,48%
0,33	22,54	43,270	43,270	22,536	19,89%
0,67	27,19	52,209	52,209	27,192	24,00%
1,00	37,40	71,807	71,807	37,399	33,01%
1,33	42,95	82,465	82,465	42,951	37,90%
1,67	56,20	107,908	107,908	56,202	49,60%
2,00	62,38	119,770	119,770	62,380	55,05%
2,33	59,38	114,011	114,011	59,381	52,40%
2,67	64,53	123,895	123,895	64,529	56,95%
3,00	62,20	119,426	119,426	62,201	54,89%
3,50	69,63	133,694	133,694	69,632	61,45%
4,00	79,84	153,292	153,292	79,840	70,46%
5,00	86,17	165,446	165,446	86,170	76,05%
6,00	91,99	176,620	176,620	91,990	81,18%
7,00	77,84	149,459	149,459	77,843	68,70%
8,00	94,32	181,090	181,090	94,318	83,24%
23,0	104,26	200,172	200,172	104,256	92,01%
24,0	107,659	206,705	206,705	107,659	95,01%

Tabela 13 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Cellic Ctec 2, 15 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	5,963	11,032	11,032	5,963	5,07%
0,33	10,942	20,242	20,242	10,942	9,30%
0,67	15,374	28,441	28,441	15,374	13,07%
1,00	19,671	36,392	36,392	19,671	16,73%
1,33	19,268	35,647	35,647	19,268	16,38%
1,67	20,611	38,131	38,131	20,611	17,53%
2,00	26,342	48,732	48,732	26,342	22,40%
2,33	26,924	49,809	49,809	26,924	22,89%
2,67	30,863	57,097	57,097	30,863	26,24%
3,00	31,042	57,428	57,428	31,042	26,40%
3,50	40,865	75,600	75,600	40,865	34,75%
4,00	49,013	90,673	90,673	49,013	41,68%
5,00	57,250	105,912	105,912	57,250	48,68%
6,00	55,459	102,599	102,599	55,459	47,16%
7,00	64,950	120,157	120,157	64,950	55,23%
8,00	74,530	137,881	137,881	74,530	63,38%
23,0	102,913	190,389	190,389	102,913	87,51%
24,0	102,286	189,230	189,230	102,286	86,98%

Tabela 14 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Celluclast 1,5L, 35 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	1,061	1,719	1,450	0,7554	0,67%
0,33	5,068	8,210	6,927	3,6157	3,19%
0,67	9,464	15,332	12,936	6,7671	5,97%
1,00	16,627	26,936	22,727	11,9146	10,51%
1,33	25,402	41,151	34,721	18,2421	16,10%
1,67	25,849	41,876	35,333	18,6043	16,42%
2,00	29,341	47,533	40,106	21,1640	18,68%
2,33	29,520	47,823	40,351	21,3401	18,83%
2,67	33,818	54,785	46,225	24,5009	21,62%
3,00	35,251	57,106	48,183	25,5953	22,59%
3,50	35,045	56,773	47,902	25,5307	22,53%
4,00	38,089	61,704	52,063	27,8412	24,57%
5,00	42,029	68,086	57,448	30,9276	27,29%
6,00	46,147	74,759	63,078	34,1884	30,17%
7,00	50,624	82,011	69,197	37,7609	33,32%
8,00	55,446	89,822	75,787	41,6415	36,75%
23,0	102,005	165,247	139,427	85,4073	75,37%
24,0	102,900	166,698	140,651	86,8218	76,62%

Tabela 15 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Celluclast 1,5L, 25 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	2,70	3,746	3,045	1,781	1,40%
0,33	3,72	5,177	4,209	2,468	1,94%
0,67	8,61	11,973	9,732	5,721	4,50%
1,00	13,40	18,631	15,145	8,926	7,02%
1,33	19,27	26,783	21,771	12,865	10,11%
1,67	27,64	38,420	31,230	18,503	14,54%
2,00	27,95	38,855	31,584	18,762	14,75%
2,33	28,80	40,038	32,545	19,384	15,24%
2,67	29,25	40,660	33,051	19,737	15,51%
3,00	31,67	44,020	35,782	21,425	16,84%
3,50	34,06	47,343	38,484	23,135	18,18%
4,00	36,39	50,579	41,114	24,815	19,50%
5,00	40,78	56,678	46,071	28,032	22,03%
6,00	43,46	60,411	49,106	30,123	23,68%
7,00	44,27	61,531	50,017	30,934	24,31%
8,00	47,16	65,558	53,289	33,231	26,12%
23,0	93,27	129,652	105,390	75,058	59,00%
24,0	100,550	139,764	113,609	81,686	64,20%

Tabela 16 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Celluclast 1,5L, 15 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	5,963	3,876	2,399	2,285	1,10%
0,33	10,942	7,112	4,403	4,215	2,03%
0,67	15,374	9,993	6,186	5,955	2,87%
1,00	19,671	12,786	7,915	7,660	3,70%
1,33	19,268	12,524	7,753	7,544	3,64%
1,67	20,611	13,397	8,294	8,114	3,92%
2,00	26,342	17,122	10,599	10,426	5,03%
2,33	26,924	17,500	10,834	10,715	5,17%
2,67	30,863	20,061	12,419	12,351	5,96%
3,00	31,042	20,178	12,491	12,492	6,03%
3,50	40,865	26,562	16,443	16,583	8,00%
4,00	49,013	31,858	19,722	20,059	9,68%
5,00	57,250	37,212	23,036	23,835	11,50%
6,00	55,459	36,048	22,316	23,495	11,34%
7,00	64,950	42,217	26,135	28,008	13,52%
8,00	74,530	48,445	29,990	32,725	15,79%
23,0	102,913	66,894	41,410	62,187	30,01%
24,0	102,286	66,486	41,158	63,398	30,60%

Tabela 17 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Optimase, 35 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	3,837	7,175	7,175	3,8367	3,30%
0,33	6,823	12,759	12,759	6,8229	5,86%
0,67	17,970	33,604	33,604	17,9701	15,45%
1,00	17,522	32,767	32,767	17,5224	15,06%
1,33	22,223	41,557	41,557	22,2231	19,10%
1,67	22,760	42,562	42,562	22,7603	19,56%
2,00	24,372	45,576	45,576	24,3720	20,95%
2,33	27,282	51,017	51,017	27,2819	23,45%
2,67	28,580	53,445	53,445	28,5801	24,57%
3,00	31,284	58,502	58,502	31,2844	26,89%
3,50	25,733	48,121	48,121	25,7331	22,12%
4,00	32,359	60,511	60,511	32,3588	27,81%
5,00	42,924	80,268	80,268	42,9241	36,89%
6,00	49,908	93,328	93,328	49,9079	42,90%
7,00	50,893	95,169	95,169	50,8928	43,74%
8,00	38,000	71,059	71,059	37,9996	32,66%
23,0	76,823	143,658	143,658	76,8225	66,03%
24,0	82,307	153,913	153,913	82,3066	70,75%

Tabela 18 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Optimase, 25 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	3,680	6,992	6,992	3,680	3,21%
0,33	6,062	11,517	11,517	6,062	5,29%
0,67	9,778	18,577	18,577	9,778	8,54%
1,00	13,001	24,702	24,702	13,001	11,35%
1,33	9,643	18,322	18,322	9,643	8,42%
1,67	14,210	26,998	26,998	14,210	12,41%
2,00	20,074	38,141	38,141	20,074	17,53%
2,33	21,641	41,118	41,118	21,641	18,90%
2,67	23,700	45,031	45,031	23,700	20,70%
3,00	25,465	48,383	48,383	25,465	22,24%
3,50	25,912	49,233	49,233	25,912	22,63%
4,00	26,808	50,934	50,934	26,808	23,41%
5,00	30,926	58,760	58,760	30,926	27,01%
6,00	40,148	76,282	76,282	40,148	35,06%
7,00	41,671	79,174	79,174	41,671	36,39%
8,00	43,103	81,896	81,896	43,103	37,64%
23,0	79,509	151,066	151,066	79,509	69,44%
24,0	81,971	155,745	155,745	81,971	71,59%

Tabela 19 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Optimase, 15 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	4,016	7,028	6,795	3,754	3,12%
0,33	9,030	15,802	15,278	8,445	7,03%
0,67	12,768	22,344	21,603	11,946	9,94%
1,00	13,641	23,872	23,080	12,769	10,62%
1,33	16,506	28,886	27,928	15,458	12,86%
1,67	15,924	27,867	26,943	14,920	12,41%
2,00	20,580	36,015	34,821	19,291	16,05%
2,33	20,267	35,467	34,291	19,006	15,81%
2,67	21,386	37,425	36,185	20,065	16,69%
3,00	23,691	41,460	40,086	22,239	18,50%
3,50	25,191	44,084	42,623	23,663	19,69%
4,00	23,298	40,771	39,419	21,900	18,22%
5,00	27,058	47,352	45,782	25,470	21,19%
6,00	32,385	56,675	54,796	30,527	25,40%
7,00	33,908	59,338	57,371	32,006	26,63%
8,00	35,385	61,924	59,871	33,447	27,83%
23,0	73,814	129,175	124,892	71,265	59,29%
24,0	75,157	131,525	127,165	72,666	60,45%

Tabela 20 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Novozyme NS-22192, 35 FPU/g_{H_C}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	3,949	6,318	5,320	2,8002	2,45%
0,33	6,791	10,866	9,151	4,8267	4,22%
0,67	17,433	27,893	23,489	12,4169	10,84%
1,00	27,864	44,582	37,543	19,8903	17,37%
1,33	37,131	59,409	50,029	26,5640	23,20%
1,67	42,145	67,432	56,785	30,2180	26,39%
2,00	46,353	74,165	62,455	33,3091	29,09%
2,33	51,098	81,758	68,848	36,8010	32,14%
2,67	53,668	85,869	72,311	38,7381	33,83%
3,00	64,144	102,631	86,426	46,4031	40,52%
3,50	68,531	109,650	92,337	49,7438	43,44%
4,00	70,143	112,229	94,509	51,0857	44,61%
5,00	82,409	131,855	111,036	60,4277	52,77%
6,00	91,900	147,040	123,824	67,8485	59,25%
7,00	90,924	145,479	122,509	67,5910	59,03%
8,00	101,557	162,491	136,835	76,0192	66,39%
23,0	119,576	191,322	161,113	99,9150	87,26%
24,0	125,732	201,171	169,407	105,8793	92,47%

Tabela 21 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Novozyme NS-22192, 25 FPU/g_{H_C}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	8,48	14,160	12,190	6,283	5,60%
0,33	22,54	37,636	32,398	16,732	14,92%
0,67	27,19	45,411	39,091	20,229	18,04%
1,00	37,40	62,457	53,765	27,876	24,86%
1,33	42,95	71,728	61,745	32,076	28,60%
1,67	56,20	93,857	80,795	42,055	37,50%
2,00	62,38	104,175	89,676	46,770	41,70%
2,33	59,38	99,166	85,364	44,608	39,78%
2,67	64,53	107,763	92,765	48,572	43,31%
3,00	62,20	103,876	89,419	46,912	41,83%
3,50	69,63	116,286	100,102	52,673	46,97%
4,00	79,84	133,332	114,776	60,574	54,01%
5,00	86,17	143,904	123,876	65,769	58,65%
6,00	91,99	153,623	132,243	70,635	62,99%
7,00	77,84	129,998	111,906	60,135	53,62%
8,00	94,32	157,511	135,589	73,307	65,37%
23,0	104,26	174,108	149,876	89,207	79,55%
24,0	107,659	179,790	154,768	92,742	82,70%

Tabela 22 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Novozyme NS-22192, 15 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	5,963	9,243	7,385	3,807	3,39%
0,33	10,942	16,959	13,550	7,004	6,25%
0,67	15,374	23,829	19,039	9,869	8,80%
1,00	19,671	30,491	24,361	12,664	11,29%
1,33	19,268	29,866	23,862	12,439	11,09%
1,67	20,611	31,948	25,525	13,344	11,90%
2,00	26,342	40,830	32,622	17,103	15,25%
2,33	26,924	41,732	33,342	17,530	15,63%
2,67	30,863	47,838	38,221	20,153	17,97%
3,00	31,042	48,116	38,443	20,328	18,13%
3,50	40,865	63,340	50,607	26,876	23,97%
4,00	49,013	75,969	60,697	32,375	28,87%
5,00	57,250	88,737	70,898	38,148	34,02%
6,00	55,459	85,962	68,681	37,282	33,24%
7,00	64,950	100,672	80,434	44,052	39,28%
8,00	74,530	115,522	92,298	51,005	45,48%
23,0	102,913	159,516	127,448	81,431	72,61%
24,0	102,286	158,544	126,672	81,787	72,93%

Tabela 23 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Serzym 42, 35 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	2,615	4,471	3,901	1,9902	1,79%
0,33	9,218	15,763	13,752	7,0288	6,33%
0,67	14,631	25,018	21,827	11,1759	10,07%
1,00	17,809	30,454	26,569	13,6281	12,28%
2,00	40,507	69,266	60,431	31,1630	28,07%
2,33	45,655	78,070	68,112	35,1867	31,70%
2,67	49,460	84,577	73,789	38,1878	34,40%
3,00	54,206	92,692	80,869	41,9269	37,77%
3,50	68,149	116,534	101,670	52,8542	47,62%
4,00	69,548	118,927	103,757	54,0854	48,73%
5,00	72,290	123,616	107,848	56,5242	50,92%
6,00	77,270	132,132	115,278	60,7496	54,73%
7,00	85,384	146,007	127,384	67,4989	60,81%
8,00	87,119	148,974	129,972	69,2519	62,39%
22,0	106,369	181,892	158,691	91,6655	82,58%
23,0	108,048	184,763	161,196	93,6750	84,39%
24,0	105,866	181,031	157,940	92,3409	83,19%

Tabela 24 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Serzym 42, 25 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	4,652	9,117	9,025	4,558	4,15%
0,33	5,211	10,214	10,111	5,107	4,65%
0,67	7,562	14,821	14,671	7,412	6,75%
1,00	17,097	33,510	33,172	16,760	15,25%
2,00	41,317	80,981	80,163	40,519	36,88%
3,00	51,098	100,153	99,141	50,132	45,62%
4,00	50,689	99,351	98,347	49,751	45,28%
5,00	61,434	120,410	119,193	60,321	54,90%
6,00	77,662	152,217	150,680	76,286	69,43%
7,00	81,691	160,114	158,497	80,276	73,06%
8,00	84,825	166,257	164,577	83,389	75,89%
23,0	97,528	191,154	189,224	96,464	87,79%
24,0	80,852	158,469	156,869	80,002	72,81%

Tabela 25 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio da Serzym 42, 15 FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	1,898	3,550	3,476	1,820	1,60%
0,33	2,458	4,596	4,500	2,357	2,07%
1,00	2,727	5,099	4,992	2,616	2,30%
2,00	10,203	19,079	18,680	9,797	8,60%
3,00	24,529	45,869	44,908	23,575	20,70%
4,00	31,759	59,389	58,145	30,551	26,82%
5,00	37,865	70,808	69,325	36,458	32,01%
6,00	43,551	81,440	79,734	41,970	36,85%
7,00	54,788	102,453	100,307	52,846	46,39%
8,00	51,654	96,593	94,570	49,868	43,78%
23,0	97,452	182,234	178,418	95,365	83,72%
24,0	98,302	183,825	179,975	96,285	84,53%

Tabela 26 - Valores obtidos pelo método DNS para o ensaio com pasta branqueada utilizando a Novozyme NS-22192, 35 FPU/g_{HC}

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
1,00	23,611	35,416	27,243	14,168	12,44%
1,33	31,848	47,772	36,748	19,201	16,87%
1,67	39,996	59,994	46,149	24,227	21,28%
2,00	45,100	67,649	52,038	27,449	24,11%
2,33	50,248	75,372	57,978	30,729	26,99%
2,67	56,354	84,532	65,024	34,629	30,42%
3,00	58,235	87,352	67,194	35,958	31,58%
3,50	61,548	92,321	71,016	38,281	33,62%
4,00	64,323	96,485	74,219	40,301	35,40%
5,00	76,679	115,019	88,476	48,761	42,83%
6,00	85,543	128,315	98,704	55,222	48,51%
7,00	88,015	132,022	101,555	57,692	50,68%
8,00	91,036	136,555	105,042	60,606	53,23%
23,0	134,685	202,028	155,406	117,137	102,89%
24,0	145,653	218,480	168,062	129,318	113,59%

Tabela 27 – Valores obtidos para a hidrólise enzimática com massas menores (400g) usando a Cellic Ctec 2, 35FPU/g_{HC}.

t (h)	C _{AR} (g/L)	m _{AR} (g)	m _{AR_C} (g)	C _{AR_C} (g/L)	x (%)
0,00	5,269	9,274	8,591	4,521	3,95%
0,33	18,095	31,848	29,501	15,543	13,57%
0,67	27,506	48,410	44,843	23,650	20,65%
1,00	36,683	64,562	59,805	31,573	27,57%
1,33	43,980	77,405	71,702	37,892	33,09%
1,67	46,890	82,527	76,446	40,440	35,32%
2,00	50,069	88,121	81,628	43,226	37,75%
2,33	53,695	94,503	87,540	46,404	40,53%
2,67	49,729	87,523	81,074	43,021	37,57%
3,00	54,743	96,347	89,248	47,407	41,40%
3,50	54,653	96,190	89,102	47,402	41,40%
4,00	57,071	100,445	93,043	49,576	43,30%
5,00	58,951	103,754	96,109	51,368	44,86%
6,00	57,698	101,548	94,065	50,432	44,04%
7,00	56,789	99,948	92,584	49,792	43,48%
8,00	60,930	107,237	99,335	53,590	46,80%
23,0	61,154	107,631	99,700	56,436	49,29%
24,0	70,667	124,374	115,209	65,430	57,14%

Tabela 28 - Valores obtidos para a hidrólise enzimática com massas menores (200g) usando a Cellic Ctec 2, 35FPU/g_{HC}.

t (h)	C_{AR} (g/L)	m_{AR} (g)	m_{AR_c} (g)	C_{AR_c} (g/L)	x (%)
0,00	6,523	11,480	10,634	5,426	4,89%
0,33	17,916	31,533	29,209	14,972	13,49%
0,67	25,267	44,470	41,194	21,213	19,11%
1,00	27,640	48,646	45,062	23,313	21,00%
1,33	27,953	49,198	45,573	23,688	21,34%
1,67	28,983	51,010	47,252	24,677	22,23%
2,00	30,102	52,980	49,076	25,751	23,20%
2,33	30,120	53,012	49,106	25,889	23,32%
2,67	30,837	54,273	50,274	26,632	23,99%
3,00	29,315	51,594	47,792	25,439	22,92%
3,50	31,195	54,903	50,857	27,267	24,57%
4,00	30,479	53,642	49,690	26,836	24,18%
5,00	30,479	53,642	49,690	27,235	24,54%
6,00	35,493	62,467	57,864	32,193	29,00%
7,00	32,390	57,007	52,806	29,829	26,87%
8,00	31,607	55,628	51,529	29,560	26,63%
23,0	43,023	75,720	70,141	52,473	47,27%
24,0	47,499	83,599	77,439	59,132	53,27%

