



**TERESA
MARGARIDA
PEREIRA DE
ALMEIDA GOMES**

**EXTRAÇÃO DE XILANAS DE PASTA BRANCA
KRAFT DO *E. globulus***



**TERESA
MARGARIDA
PEREIRA DE
ALMEIDA GOMES**

**EXTRAÇÃO DE XILANAS DE PASTA BRANCA
KRAFT DO *E. globulus***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Química, ramo de Química dos Recursos Renováveis e Bio-Refinarias, realizada sob a orientação científica do Doutor Dmitry Evtyugin, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Eng.º Paulo Mendes de Sousa, Técnico Superior de Investigação do RAIZ, Instituto de Investigação da Floresta e do Papel, Eixo.

“Real generosity toward the future lies in giving all to the present.”

Albert Camus

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares de Silva
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Dmitry V. Evtugin
Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Paula Cristina de Oliveira Rodrigues Pinto
Investigadora Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Universidade do Porto

agradecimentos

Ao meu Professor e Orientador Dmitry Evtugin, pelos conhecimentos e experiência transmitidos e grande disponibilidade ao longo de todo o ano letivo.

Ao Instituto de Investigação da Floresta e do Papel (RAIZ) pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho nas suas instalações, através da disponibilização de meios técnicos e humanos. No geral a todo o pessoal técnico, em particular ao Eng.º Paulo Mendes de Sousa, como co-Orientador, pelos conhecimentos e entusiasmo revelados acerca deste tema e ao Mestre Bruno Almeida pelo seu apoio no trabalho laboratorial.

Aos colegas do laboratório do CICECO, em particular à Mestre Sónia Prozil pelo seu acompanhamento direto no trabalho.

Aos meus amigos em geral por terem contribuído, de uma forma tão preciosa, para a minha reentrada no “mundo académico”. Um particular agradecimento à Bárbara Ferreira pela disponibilidade e apoio em todos os aspetos e à Joana Barata pelo apoio e ferramentas tecnológicas facultadas. À Filipa Vasconcelos, amiga de longa data e Isabel Lima, amiga recente, ambas com um bom-humor e inteligência contagiante que muito me ajudaram a manter a necessária boa disposição.

Um muito especial obrigada à Filipa Belchior, amiga “veterana” pelo acompanhamento, envolvimento e apoio direto neste trabalho.

Aos meus filhos Rita e André; com eles e para eles tudo vale a pena.

Aos meus Pais, pelo seu apoio incondicional ao longo de toda a minha vida, nesta fase em particular.

palavras-chave

Eucalyptus globulus, madeira; pasta branca kraft; hemiceluloses; isolamento e extração de xilanas; estrutura das xilanas; aptidão indústria papelreira e não papelreira das xilanas.

resumo

A indústria da pasta e do papel tem um importante peso na indústria portuguesa, contribuindo com 4,5% do PIB industrial. Antevendo alterações no cenário produtivo da indústria da pasta celulósica, a investigação científica tem desenvolvido trabalhos na área dos produtos alternativos ao papel de valor acrescentado, como a pasta solúvel e celulose micro-fibrilada (CMF), cuja produção pressupõe a eliminação das hemiceluloses mais abundantes da pasta (xilanas). Sendo o *E. globulus* a espécie de madeira mais usada no processamento da pasta celulósica kraft nacional, há um crescente interesse no desenvolvimento desses produtos a partir da pasta celulósica kraft branca dessa espécie. Nesse âmbito, o isolamento, a caracterização química e estrutural das xilanas, presentes na pasta branca, revelam-se muito importantes para o seu processamento posterior visando igualmente produtos de valor acrescentado.

Sendo assim, este trabalho teve dois objetivos principais: 1.º) avaliação do perfil de extração alcalina das xilanas da pasta branca kraft do *E. globulus* com solução de hidróxido de sódio; 2.º) caracterização química e estrutural das xilanas isoladas. Foi determinado o teor de pentosanas removido e os parâmetros correspondentes que resultaram numa melhor relação entre a taxa máxima de remoção e o rendimento de xilana: extração com solução de NaOH 10% durante 1 hora. No entanto, dependendo do processamento posterior das xilanas e para dar resposta ao interesse industrial, foi igualmente estudado o tempo da extração alcalina com NaOH a 5%, concentração que resultou no teor de pentosanas removido em cerca de 70% do máximo encontrado com NaOH 10%.

As xilanas extraídas com diferentes tempos de extração e com hidróxido de sódio de concentração 5% e 10% foram caracterizadas quimicamente e estruturalmente através de análise de açúcares neutros e por metanólise ácida, RMN 1D e 2D e os pesos moleculares determinados através de SEC. A pureza das xilanas extraídas foi avaliada através da análise dos monossacarídeos neutros que demonstraram teores de xilose compreendidos entre 93,5% e 99,6%. Nas xilanas resultantes da extração com NaOH 10%, os teores de glucose apresentaram-se entre 2,3% e 6,5%. O elevado grau de pureza de todas as amostras de xilanas isoladas e a previsível co-precipitação da β - e γ -celulose na extração com NaOH 10% foram confirmados através de metanólise ácida.

Através de RMN de ^1H foi possível observar, em todas as amostras de xilanas da pasta branca kraft, os sinais normalmente correspondentes às ressonâncias dos prótons anoméricos das unidades urónicas (MeGlcA e MeGlcA-2Gal) e da cadeia polimérica principal da xilana, concluindo-se a concordância da sua

estrutura face às condições extractivas. As estruturas de xilanas foram confirmadas através de RMN de ^{13}C e técnicas RMN bidimensionais. Através de SEC, as amostras extraídas com NaOH 10% apresentaram um peso molecular ligeiramente superior às amostras extraídas com NaOH 5%. Foi também demonstrada a tendência para o seu aumento até às 2 horas de extração, tempo a partir do qual aumenta o risco de degradação e conversão em derivados com menor peso molecular.

Em conclusão, este trabalho permitiu, por um lado, otimizar o perfil de extração alcalina e, por outro, dar um contributo para o conhecimento das características estruturais das xilanas da pasta branca kraft do *E. globulus*, informação importante *per se* e fundamental para a I&D do seu processamento posterior, trabalhos associados já a decorrer e futuros.

keywords

Eucalyptus globulus, wood; kraft bleached pulp; hemicelluloses; xylans extraction and isolation, xylans structure, paper and not paper industry

abstract

The paper and pulping industry have an important contribution to the Portuguese industry, representing 4,5% of the industrial GDP (Gross Domestic Product). Anticipating changes in the productive scenario of the cellulosic pulping industry, research has been developing studies on alternative products to the value added products, as soluble pulp and microfibrillated cellulose (MFC), which production presumes the elimination of the more abundant hemicelluloses in the pulp (xylans). As the *E. globulus* is the most used specie in the national processing of cellulosic kraft pulp, there is an increasing interest in the developing of those products from the bleached cellulosic kraft pulp of this specie. Therefore, the isolation, the chemical and the structural characterisation of the xylans present in the bleached pulp are very important for its afterwards processing, having as scope value added products.

This work had two main goals: 1.st) evaluation of the alkaline extraction profile of the xylans present in the kraft bleached pulp of the *E. globulus* with sodium hydroxide solution; 2.nd) chemical and structural characterisation of the isolated xylans. It had been determined the pentosans pulp content and the parameters which showed a better correlation between the maximum solubility value and the xylans extraction yield: extraction with a 10% NaOH solution for one hour. However, depending on the afterwards processing of the xylans, and to respond to the industrial interest on the subject, it had also been studied the kinetics of the alkaline extraction with a 5% solution of NaOH, which removed a pentosans content of around 70% of the maximum obtained with a 10% NaOH solution.

The xylans extracted with different extraction times, and 5% and 10% of sodium hydroxide solutions, were chemically and structurally characterised using neutral sugars analysis and acid methanolysis, NMR 1D and 2D, and its molecular weights were determined using SEC. The xylans purity was evaluated by the neutral viiionosaccharides analysis, which showed xylans contents between 93,5% and 96,6%. The xylans extracted with NaOH 10% solution presented glucose contents in the range 93,5% - 99,6%. The high purity level of all isolated xylans samples, and the expected co-precipitation of the β - e γ -cellulose in the extraction with NaOH 10% solution, were confirmed with acid methanolysis.

The ^1H NMR of all xylans extracted from the bleached kraft pulp showed the signals usually corresponding to the resonance of the anomeric protons of the uronic units (MeGlcA and MeGlc-2Gal), and of the main polymeric chain of the xylans, which showed the independence of the structure from the extraction conditions. The xylans structures were confirmed by ^{13}C NMR and bidimensional NMR analyses. SEC results showed that the xylans extracted

with NaOH 10% solution have a molecular weight slightly higher than the samples extracted with NaOH 5%. It had also been showed that the xylans molecular weight tends to increase until two hours of extraction time reaction. After two hours, it started increasing the risk of degradation and conversion into lower molecular weight compounds.

In conclusion, this work not only allowed to optimise the alkaline extraction profile, but also gave a contribution to the knowledge of the structural characteristics of the xylans of the bleached kraft pulp from the *E. globulus*. This information is important *per se* and essential for the R&D of the afterwards processing of the pulp, ongoing and future works.

Índice Geral

| | |
|---|------|
| Índice de Tabelas: | xii |
| Índice de Figuras: | xiii |
| Introdução | 16 |
| Motivação e Objetivos | 16 |
| 1. Revisão Bibliográfica | 18 |
| 1.1. Química da madeira do <i>E. globulus</i> | 19 |
| 1.1.1. Celulose | 21 |
| 1.1.2. Lenhina | 22 |
| 1.1.3. Hemiceluloses | 23 |
| 1.1.4. Componentes extractáveis | 28 |
| 1.1.5. Compostos inorgânicos (Cinzas) | 29 |
| 1.2. Química do cozimento kraft e do branqueamento | 29 |
| 1.2.1. Cozimento kraft | 30 |
| 1.2.2. Branqueamento | 33 |
| 1.3. Química da pasta celulósica kraft do <i>E. globulus</i> | 34 |
| 1.3.1. Celulose | 35 |
| 1.3.2. Hemiceluloses | 36 |
| 1.3.3. Lenhina residual | 37 |
| 1.3.4. Componentes Extractáveis | 38 |
| 1.4. Métodos de isolamento das xilanas da madeira e da pasta celulósica | 39 |
| 1.4.1. Isolamento das xilanas por extração alcalina | 40 |
| 1.4.2. Isolamento das xilanas por extração com solventes orgânicos | 42 |
| 1.5. Aplicação das xilanas para fins não papeleros | 43 |
| 1.5.1. Sistemas de embalagens indústria alimentar | 45 |
| 1.5.2. Pigmentos de revestimento para papel <i>offset</i> | 46 |
| 1.5.3. Farmacêutica e cosmética | 46 |
| 2. Metodologia experimental | 47 |
| 2.1. Extração alcalina das xilanas | 49 |
| 2.2. Determinação do Teor de Secura | 51 |
| 2.3. Determinação do Teor de Pentosanas | 51 |
| 2.4. Tempo da reação de extração alcalina | 52 |
| 2.5. Cálculo do rendimento | 55 |
| 2.6. Caracterização química e estrutural das xilanas extraídas | 55 |
| 2.6.1. Determinação dos açúcares neutros por hidrólise com H ₂ SO ₄ | 55 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.6.2. | Determinação dos açúcares por metanólise | 57 |
| 2.6.3. | Determinação do peso molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) | 58 |
| 2.6.4. | Análise estrutural por espectroscopia de RMN | 58 |
| 3. | Análise e discussão dos resultados | 60 |
| 3.1. | Avaliação do perfil da extração das xilanas de pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> 61 | |
| 3.1.1. | Parâmetros da extração alcalina avaliados: concentração de NaOH e tempo de reação de extração | 61 |
| 3.2. | Caracterização química e estrutural da xilana extraída (isolada e purificada)..... | 65 |
| 3.2.1. | Determinação dos açúcares neutros..... | 65 |
| 3.2.2. | Hidrólise por metanólise ácida | 66 |
| 3.2.3. | Análise estrutural por espectroscopia de RMN | 69 |
| 3.2.4. | Conclusões acerca da estrutura empírica da xilana extraída da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> | 76 |
| 3.2.5. | Determinação do peso molecular por Cromatografia Exclusão Molecular (SEC) | 77 |
| 4. | Conclusões | 81 |
| 4.1. | Conclusões gerais..... | 82 |
| 4.2. | Trabalho futuro | 83 |
| 5. | Referências Bibliográficas | 85 |
| 6. | Apêndices | 90 |

Índice de Tabelas:

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Composição química da madeira de resinosas e de folhosas (adaptado, 4). | 20 |
| Tabela 2: Composição química da madeira de <i>E. globulus</i> , % em peso (adaptado, 5). | 20 |
| Tabela 3: Composição química dos monossacarídeos da madeira de <i>E. globulus</i> (adaptado, 6). | 21 |
| Tabela 4: Processos de obtenção da pasta celulósica (adaptado, 21). | 30 |
| Tabela 5: Composição química da pasta celulósica kraft branca do <i>E. globulus</i> , % em peso (adaptado, 6, 26). | 34 |
| Tabela 6: Composição química dos monossacarídeos neutros da pasta celulósica crúa kraft do <i>E. globulus</i> (adaptado, 6). | 34 |
| Tabela 7: Composição química dos monossacarídeos neutros da pasta celulósica kraft branca do <i>E. globulus</i> (adaptado, 26). | 35 |
| Tabela 8: Massa de NaOH pesada e concentração de NaOH a estudar para 250 mL de solução e consistência de 5% da pasta. | 49 |
| Tabela 9: Tempos estudados para 250 mL de solução e consistência de 5% da pasta. | 52 |
| Tabela 10: Parâmetros de temperatura do forno (° C) do Cromatógrafo do GC/MS. | 57 |
| Tabela 11: Composição em monossacarídeos neutros das xilanas extraídas da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> | 65 |
| Tabela 12: Percentagem dos açúcares metilados obtidos por metanólise ácida das amostras selecionadas de xilanas extraídas (isoladas e purificadas) | 68 |
| Tabela 13: Desvios químicos das unidades estruturais relevantes identificadas na amostra de xilana isolada com extração alcalina com NaOH 10% durante 15 min. | 76 |
| Tabela 14: Abundância relativa das unidades estruturais relevantes identificadas. | 77 |
| Tabela 15: Resultados obtidos do SEC. | 78 |

Índice de Figuras:

| | |
|--|----|
| Figura 1: Caracterização e distribuição de fibras na madeira (3)..... | 20 |
| Figura 2: Modelo estrutural da celulose. Terminal não redutor (A), unidade de celobiose (B), terminal redutor (C) (7)..... | 22 |
| Figura 3: Estrutura dos precursores da lenhina (adaptado, 10)..... | 23 |
| Figura 4: Estrutura primária em cadeira da 4- <i>O</i> -metil-glucuronoxilana (12)..... | 25 |
| Figura 5: Representação abreviada da estrutura mais comum das hemiceluloses de folhosas de <i>E. globulus</i> , <i>O</i> -acetil-4- <i>O</i> -metilglucurono- β -D-xilana (15)..... | 26 |
| Figura 6: Estrutura de uma β – D – glucana com uma mistura de ligações β (1 \rightarrow 4) e β (1 \rightarrow 3) (12)..... | 26 |
| Figura 7: Estrutura em cadeira das glucomananas: D – gluco – D – manana (A); (D – galacto) – D – gluco – D – manana (B) (12)..... | 27 |
| Figura 8: Estrutura em anel de uma galactana (17)..... | 28 |
| Figura 9: Representação esquemática das reações de <i>peeling</i> e de <i>stopping</i> (21)..... | 32 |
| Figura 10: Conversão do MeGlcA em Ácidos Hexenurónicos durante o cozimento kraft. 37 | |
| Figura 11: Comparação do processo de isolamento das xilanas de pastas celulósicas de diferentes madeiras através da extração alcalina e da extração com nitreno (adaptado, 13)..... | 42 |
| Figura 12: Exemplos de preparação de derivados de xilanas via eterificação em | 44 |
| Figura 13: Possíveis aplicações a partir da extração da xilana a partir da pasta | 45 |
| Figura 14: Matéria-prima - pasta branca kraf do <i>E. globulus</i> | 49 |
| Figura 15: Sequência laboratorial simplificada da extração alcalina. | 50 |
| Figura 16: Exemplo de material (filtrado e pasta) + extraído após extração alcalina com um tempo definido (2 horas)..... | 53 |
| Figura 17: Sedimentação do filtrado precipitado (xilanas). | 54 |
| Figura 18: Últimas etapas do isolamento das xilanas (Diálise – (A); Centrifugação e lavagem – (B); Maceração – (C). | 55 |
| Figura 19: Teor de remoção de pentosanas da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> na extração alcalina durante 2 horas com diferentes concentrações de NaOH..... | 62 |
| Figura 20: Variação ao longo do tempo do teor de remoção de pentosanas da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> na extração alcalina com NaOH 10% | 63 |
| Figura 21: Variação ao longo do tempo do teor de remoção de pentosanas da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> na extração alcalina com NaOH 5% | 63 |
| Figura 22: Comparação da variação ao longo do tempo do teor de redução de pentosanas da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> na extração alcalina com NaOH 10% e 5% (% relativa ao Teor de Pentosanas da matéria-prima)..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 23: Cromatogramas dos açúcares metilados obtidos por metanólise ácida das xilanas isoladas e purificadas das amostras selecionadas;..... | 68 |
| Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> (a) e a região expandida dos prótons anoméricos (b). | 70 |
| Figura 25: Espectro de RMN de ^1H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 1 hora) da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> com os prótons anoméricos identificados. | 70 |
| Figura 26: Espectro de RMN de ^1H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 5%, 2 horas) da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> (a) e região expandida dos prótons anoméricos (b). | 71 |
| Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> (impurezas representadas por *). | 72 |
| Figura 28: Espectro de RMN 2D TOCSY ^1H - ^1H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> | 74 |
| Figura 29: Espectro de RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do <i>E. globulus</i> | 75 |
| Figura 30: Curvas de Eluição para as amostras obtidas a partir da extração alcalina com soluções de NaOH a 10%. | 78 |
| Figura 31: Curvas de Eluição para as amostras obtidas a partir da extração alcalina com soluções de NaOH a 5%. | 79 |
| Figura 32: Mecanismo da hidrólise alcalina da ligação glicosídica (10). | 80 |

Abreviaturas e Simbologias

| | |
|------------------|---|
| Ara | Arabinose |
| CMF | Celulose Micro-Fibrilada |
| DMAC | Dimetil-Acetamida |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| DMF | Dimetilformamida |
| DS | Grau de Substituição |
| EtOH | Etanol |
| FID | <i>Flame Ionization Detector</i> |
| Gal | Galactose |
| Galp | Galactopiranoose |
| GC | Cromatografia Gasosa |
| Glc | Glucose |
| Glc _p | Glucopiranoose |
| HexA | Ácido hexenurónico |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> |
| Man | Manose |
| MeGlcA | Ácido metilglucurónico |
| MeOH | Metanol |
| M _w | Massa molecular ponderada |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> |
| NMC | Novos Materiais Celulósicos |
| Rha | Ramnose |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| SEC | Cromatografia de Exclusão Molecular |
| Tol | Tolueno |
| TOCSY | <i>Total Correlation Spectroscopy</i> |
| XRD | Difracção de Raios-X |
| Xyl | Xilose |
| Xyl _p | Xilopiranoose |
| Xyl _f | Xilofuranoose |

Introdução

Portugal foi pioneiro no processamento industrial de pastas químicas de eucalipto, em especial de pastas químicas da madeira da espécie *E. globulus*. Desde a 2ª década do Séc. XX que a indústria da pasta e do papel assume um crescente peso na indústria portuguesa tendo hoje uma posição de destaque no mercado nacional representando 1% no PIB Nacional e 4,5% do PIB industrial. No mercado internacional, Portugal é o 3.º maior produtor europeu de pastas químicas e o 4.º maior produtor europeu do mercado global das pastas.

A perspectiva de alterações a médio prazo no cenário produtivo da indústria da pasta celulósica é um dos motores da investigação de produtos alternativos ao papel; produtos de valor acrescentado, como a pasta solúvel e celulose micro-fibrilada (CMF). A investigação nacional nesta área é uma realidade há alguns anos, tendo o CICECO (Centro de Investigação em materiais Cerâmicos e Compósitos) um papel preponderante na busca do conhecimento da química da madeira do *E. globulus*, espécie mais usada em Portugal no processamento da pasta celulósica kraft, e da qual se tinha um conhecimento insuficiente. Este conhecimento leva a uma melhor compreensão das alterações estruturais que os constituintes dessa madeira sofrem nas várias fases do processo produtivo de pasta, nomeadamente no processo produtivo kraft e sulfito ácido, os processos mais utilizados nas unidades fabris nacionais.

Motivação e Objetivos

No âmbito da produção nacional de pasta solúvel ao sulfito ácido e pasta kraft, o constituinte predominante das hemiceluloses (xilana) nas pastas é extraído para fins tecnológicos de produção de, respetivamente, viscose e de celulose micro-fibrilada (CMF), havendo um interesse crescente na caracterização química e estrutural das xilanas removidas que poderão ser aproveitadas na produção de produtos de alto valor acrescentado na indústria farmacêutica, cosmética, alimentar, entre outras.

Este trabalho integra-se no projecto QREN n.º 34169 aprovado em 21/06/2013 para o desenvolvimento de NMC (Novos Materiais Celulósicos) a partir de pasta branca kraft

do *E. globulus* por parte do promotor PORTUCEL – Fábrica de Cacia, SA que visa a obtenção e caracterização de CMF e de xilana removida.

As hemiceluloses apresentam um elevado grau de retenção nas fibras celulósicas após a deslenhificação convencional kraft e o branqueamento. Estas hemiceluloses (essencialmente xilanas) devem ser eliminadas, por extração apropriada, antes da produção de CMF por método de refinação/homogeneização. Foi utilizada neste trabalho uma extração com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) por ser um dos processos mais viáveis de extração das xilanas, devido à facilidade de recuperação do reagente a nível industrial. Sendo assim, é relevante definir um perfil de extração das xilanas da pasta branca kraft e sua estrutura. A pasta celulósica branca kraft do *E. globulus* foi a matéria-prima do presente trabalho que tem dois objetivos interligados: avaliar o perfil de extração alcalina das xilanas da pasta branca kraft de *E. globulus* com soluções de NaOH de diferentes concentrações e definir o tempo de reação de extração com a solução que apresente a melhor taxa de remoção de xilanas da pasta e estudar a estrutura das xilanas extraídas em meio alcalino e os seus pesos moleculares. Apesar de não haver literatura específica para o método de isolamento das xilanas da pasta kraft branca da madeira do *E. globulus*, nem para a especificidade da refinação anterior à extração alcalina, a metodologia experimental de diversos trabalhos de investigação descrevem o seu isolamento a partir da madeira do *E. globulus*, de outras madeiras e de pastas celulósicas, que foi orientadora para o trabalho proposto.

O presente trabalho será estruturado em quatro capítulos e uma secção de Apêndice. O primeiro capítulo consiste numa revisão bibliográfica da química da madeira do *E. globulus*, cozimento kraft e branqueamento de pasta celulósica, química da pasta celulósica kraft do *E. globulus* e também dos métodos de isolamento das xilanas da madeira e da pasta celulósica já estudados, para além das aplicações das xilanas para fins não papeleiros já em curso. O segundo capítulo descreve toda a metodologia experimental seguida para traçar o perfil de extração e isolamento das xilanas, bem como para a sua caracterização química e estrutural. No terceiro capítulo analisam-se e discutem-se os resultados obtidos e por último no quarto capítulo são retratadas as principais conclusões do trabalho realizado.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Química da madeira do *E. globulus*

Neste capítulo apresentar-se-á uma breve descrição da morfologia e composição química da madeira do *E. globulus*.

A madeira é um material biocompósito, composto essencialmente por componentes químicos microscópicos e macroscópicos, variável em função da idade, localização geográfica e características do solo. É constituída por três tipos de células que se encontram predominantemente alinhadas longitudinalmente e com funções distintas e bem definidas: as de condução (transporte de líquidos e nutrientes); as de armazenamento (de reservas de nutrientes) e as de suporte. Existem dois grandes grupos de árvores distinguidos pelo tipo de folha: as folhosas (*hardwood*), de folha caduca (por ex. eucalipto) onde os vasos e as fibras constituem as células de condução e de suporte respetivamente; as resinosa (*softwood*), de folha perene, onde o grupo maioritário das suas células denomina-se por traqueídeos que são em simultâneo células de condução e de suporte. Para além disso, o tamanho das fibras é distinto; as fibras das resinosa são longas, enquanto que as das folhosas são curtas (Figura 1) (1-3).

Estes dois grupos de árvores diferem também quimicamente no teor dos componentes macromoleculares, pois as folhosas apresentam normalmente maiores teores de celulose e menor teor de lenhina que as resinosa e também uma composição diferente das hemiceluloses (Tabela 1) (4). O *E. globulus* é das árvores folhosas a que apresenta uma maior proporção de celulose e menor proporção da lenhina (5). A composição química da madeira, bem como o teor dos monossacarídeos neutros da madeira do *E. globulus* são apresentados nas Tabela 2 e Tabela 3.

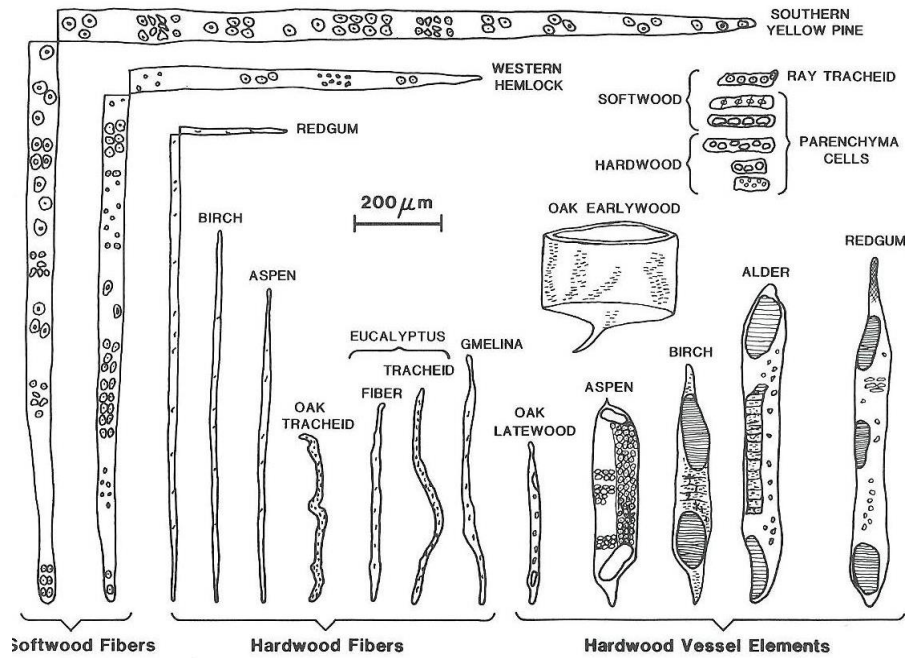


Figura 1: Caracterização e distribuição de fibras na madeira (3).

Tabela 1: Composição química da madeira de resinosas e de folhosas (adaptado, 4).

| Componentes Macromoleculares (%) | Resinosas | Folhosas |
|----------------------------------|-----------|----------|
| Celulose | 40-44 | 43-50 |
| Hemicelulose | 30-32 | 15-35 |
| Lenhina | 25-32 | 18-25 |

Tabela 2: Composição química da madeira de *E. globulus*, % em peso (adaptado, 5).

| Principais Componentes | % em peso p/p (w/w) |
|-----------------------------------|---------------------|
| Lenhina (Klason) | 20,5 |
| Celulose (Kurschner-Hoffer) | 50,0 |
| Pentosanas | 14,1 |
| Extractáveis EtOH/tol.; 2:1, v/v) | 1,72 |
| Cinzas | 0,17 |

Tabela 3: Composição química dos monossacarídeos da madeira de *E. globulus* (adaptado, 6).

| Monossacarídeos Neutros | % |
|-------------------------|------|
| Glc | 53,4 |
| Xyl | 14,2 |
| Rha | 0,3 |
| Ara | 0,4 |
| Man | 1,1 |
| Galc | 1,5 |

1.1.1. Celulose

A celulose apresenta-se quimicamente como um homopolímero (constituído por apenas um tipo de monossacarídeo) amorfo-cristalino e as suas cadeias organizam-se em diferentes níveis estruturais (2):

- Fibrilas elementares: primeiro nível de organização supramolecular onde moléculas de celulose se agregam alternadamente entre as suas zonas cristalinas (mais coesas e estáveis) e as zonas amorfas (menos ordenadas);
- Microfibrilas: segundo nível resultado da organização das fibrilas elementares separadas por zonas com um grau de organização intermédio entre a celulose cristalina e amorfa;
- Macrofibrilas: terceiro nível onde as microfibrilas se organizam em macrofibrilas, separadas por uma matriz de lenhina e hemiceluloses. Por sua vez as macrofibrilas juntam-se sob a forma de lamelas, as quais são os constituintes mais básicos da parede celular de qualquer planta.

A cadeia principal da celulose é linear e é formada estruturalmente por unidades de glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), ou seja, as unidades de β -D-glucopiranosose estão unidas por ligações glicosídicas entre os grupos hidroxilos do C₁ de um dos monómeros e do C₄ do monómero adjacente. O dissacarídeo denominado “celobiose” é a unidade estrutural que se repete esteriometricamente e é constituído por duas unidades de glucopiranosose com rotação de 180 ° entre si (Figura 2).

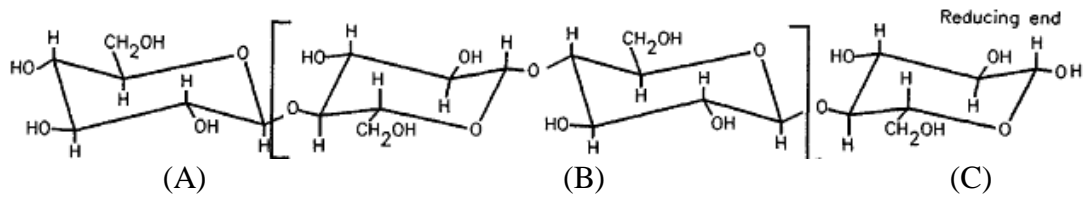


Figura 2: Modelo estrutural da celulose. Terminal não redutor (A), unidade de celobiose (B), terminal redutor (C) (7).

As zonas cristalinas da celulose são particularmente resistentes ao ataque químico e à degradação, devido à forte tendência em estabelecer ligações por pontes de hidrogénio inter e intra-moleculares. Estas pontes de hidrogénio são estabelecidas através dos três grupos hidroxilo livres presentes em cada unidade D-anidroglicopirranose nas posições C₂, C₃ e C₆.

A celulose cristalina pode apresentar diferentes formas polimorfas onde a celulose nativa das madeiras é denominada por Celulose I. A sua rede cristalina foi determinada por difracção de raios-X que revelou ser monoclinica, isto é, tem três eixos com diferentes comprimentos e um ângulo diferente de 90° ($\gamma=96-97^\circ$) (8). Contudo, estudos recentes, apontam para uma modificação na rede cristalina da Celulose I que, para além de monoclinica, pode apresentar-se também triclinica na parte exterior dos cristallitos (2).

A celulose do *E. globulus* representa cerca de 50-53% da matéria da madeira e, tal como outras celulosas nativas, tem uma estrutura amorfo-cristalina com grau de cristalinidade de 68%. O grau de cristalinidade resulta do cálculo da massa de celulose cristalina sobre a massa total de celulose determinado pela técnica de difracção de raios-X (XRD) (2).

1.1.2. Lenhina

A lenhina é o componente essencial da madeira que normalmente aparece, em abundância, imediatamente a seguir à celulose com teores que variam entre 18% e 25% (6).

A lenhina aparece depositada nas paredes celulares com uma estrutura reticulada, confere rigidez à parede celular, actuando como agente de ligação entre as células. Não apresenta fisicamente estrutura uniforme e é amorfa (9). Os seus três monómeros precursores são derivados do álcool cinamílico na forma de radicais fenoxilo: álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 3). Nas madeiras das resinosas as lenhinas são constituídas maioritariamente por unidades derivadas do guaiacilpropano (G), sendo o precursor o álcool coniferílico, enquanto nas folhosas as lenhinas são constituídas maioritariamente por unidades derivadas do seringilpropano (S), cujo precursor é o álcool sinapílico. Em ambas as madeiras aparecem em menor quantidade unidades derivadas do *p*-hidrofenilpropano (H) provenientes do precursor álcool *p*-cumarílico (2, 9).

A madeira do *E. globulus* apresenta lenhina do tipo S/G com elevada proporção de unidades S, invulgar nas folhosas. A elevada proporção de unidades S é confirmada pelo alto teor de grupos metoxilo (2) com proporção molar H:G:S de 2:14:84 (5) e por metodologias analíticas avançadas, por exemplo Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massa com Ionização por ElectroSpray (ESI-MS) e técnicas degradativas (2).

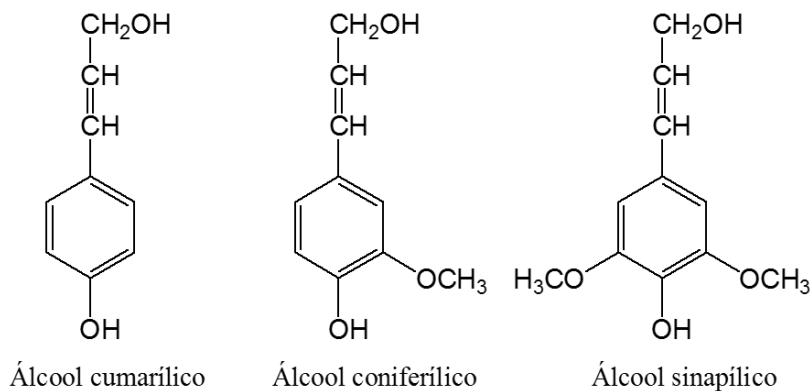


Figura 3: Estrutura dos precursores da lenhina (adaptado, 10).

1.1.3. Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos (normalmente heteropolissacarídeos) não celulósicos da parede celular das plantas. São polímeros diferentes da celulose e a sua estrutura depende fortemente do tipo de madeira; são essencialmente amorfos, com uma

estrutura ramificada e um grau de polimerização baixo, apresentando como principais funções as de suporte e reserva. Apesar de haver correntes de investigação que levam a pressupor, hoje em dia, que as hemiceluloses funcionam como reguladoras da agregação da celulose (11-12) continua a considerar-se que as interacções entre a lenhina e a celulose são feitas através das hemiceluloses, pelo que a função de coesão estará também presente (8).

As hemiceluloses são divididas em quatro grandes famílias dependendo da unidade da cadeia principal: xilanas, mananas, glucanas e galactanas e a sua percentagem na constituição da madeira varia conforme a espécie de árvore (8).

As unidades monoméricas principais que compõem as hemiceluloses e que resultam da sua hidrólise em meio ácido são a D-glucose (Glc), D-manose (Man), D-xilose (Xyl), D-galactose (Gal) e a L-arabinose (Ara). Há ainda outros componentes em menor quantidade designados por L-ramnose (Rha), ácido D-glucurónico, D-galacturónico e o ácido 4-*O*-metil-D-glucurónico. Para uma mais fácil divisão, estes componentes são normalmente subdivididos em pentoses, hexoses, ácidos hexurónicos e deoxi-hexoses (8). Análises realizadas aos açúcares neutros e ácidos das árvores do tipo folhosas mostram que, nestas, a hemicelulose principal é a *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana com teores compreendidos entre os 10% e os 35% (13) dependendo das espécies; são encontradas também glucomananas em menor proporção (3% a 5%) (6). Para a espécie *E. globulus*, em particular, as hemiceluloses representam 24-27% do peso seco da madeira, distribuídos por 16-20% de xilanas, 4-6% de glucanas e apenas 1-2% de glucomananas e 1-2% compostos pécnicos (5).

1.1.3.1. Xilanas

As xilanas são a família de hemiceluloses mais abundante na natureza e a unidade D-xilopirranose constitui a sua cadeia principal. Consoante o tipo de ligações existente entre aquelas unidades formam-se diferentes tipos de xilanas (12):

- Homoxilanas: ligações β (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 4) ou mistura destas;
- Glucuronoxilanas: ligações β (1 \rightarrow 4) as quais possuem como substituintes grupos acetilo e o ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico (MeGlcA) na posição 2; dois grupos ácidos urónicos por cada dez resíduos de xiloses) (Figura 4);

- (Arabino)glucuronoxilanas: como as glucuronoxilanas, mas também com unidades laterais de L-arabinofuranose na posição 3 (cerca de 1 unidade de arabinose por cada 10 unidades de xiloses);
- Arabinoxilanas: ligações β (1 \rightarrow 4) com grupos arabinofuranosil ligados nas posições 2 ou 3;
- Heteroxilanas: cadeia principal de xilana formada pelas unidades xilopirranose ligados por ligações β (1 \rightarrow 4 xilana) e substituída por cadeias laterais de diferentes sacarídeos.

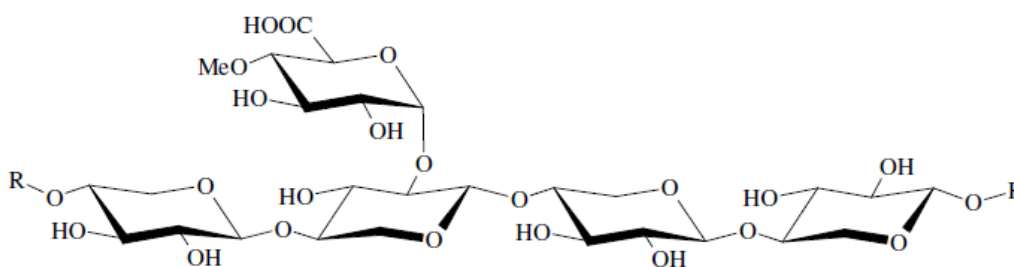


Figura 4: Estrutura primária em cadeira da 4-*O*-metil-glucuronoxilana (12).

A caracterização das glucuronoxilanas isoladas do *E. globulus* mostrou na sua constituição 3-6% de galactose, 1-2% de glucose e cerca de 1% de ramnose (2).

A percentagem de unidades de galactopirranose encontrada na madeira do *E. globulus*, demonstra a complexidade e invulgaridade da estrutura das hemiceluloses onde a ligação do último constituinte é diferente das xilanas de outras madeiras. A estrutura comum às outras xilanas reside na cadeia principal dos polissacarídeos de unidades de β -D-xilopirranose ligadas entre si por ligações β (1 \rightarrow 4) as quais possuem como substituintes grupos acetilo e o ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico. A diferença encontra-se no substituinte de ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico onde um terço das unidades deste ácido são ramificadas em *O*-2 pelos resíduos de galactopirranose, enquanto que nas xilanas de outras folhosas de referência não tenham este substituto. Inicialmente foi sugerido que as unidades de galactopirranose aparecerem apenas na forma de unidades terminais na estrutura da glucuronoxilana enquanto estas estariam ligadas ao ácido glucurónico por uma ligação Galp-(1 \rightarrow 2)-MeGlc_pA (14). Mais tarde foi detectada a presença de rhamnoarabinogalactanas e glucanas ligadas ao ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico. Esta estrutura particular e distinta da xilana do *E. globulus* é denominada

por *O*-acetil-(4-*O*-metil- α -D-glucurono)-D-xilana (Figura 5) e foi comprovada por resultados de RMN e análise de ligações por metilação (5, 15).

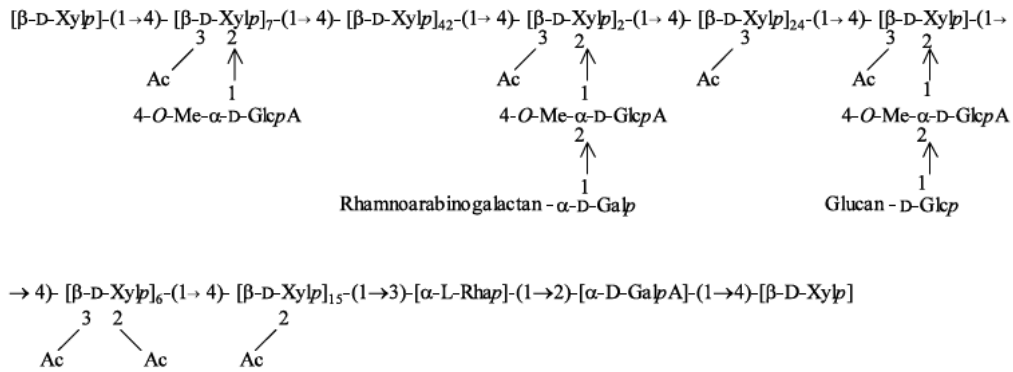


Figura 5: Representação abreviada da estrutura mais comum das hemiceluloses de folhas de *E. globulus*, *O*-acetil-4-*O*-metilglucurono- β -D-xilana (15).

1.1.3.2. Glucanas

As glucanas são a família de hemiceluloses constituídas por unidades de glucopiranosose tal como a celulose, no entanto, as suas ligações glicosídicas são distintas. A cadeia linear das glucanas apresenta unidades de glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas alternadas e aleatórias β (1 \rightarrow 4) e β (1 \rightarrow 3) (Figura 6). As unidades que são constituídas por segmentos de cadeia com ligações β (1 \rightarrow 4) mais longos associam-se fortemente à celulose (12).

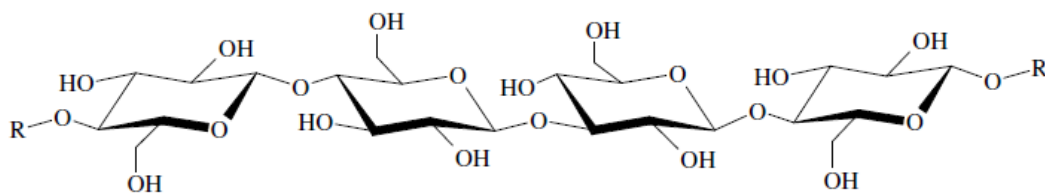


Figura 6: Estrutura de uma β - D - glucana com uma mistura de ligações β (1 \rightarrow 4) e β (1 \rightarrow 3) (12).

Uma glucana com função muito importante é o amido, polissacarídeo de glucose com funções de reserva vitais no metabolismo das árvores, cujas ligações existentes entre as unidades de D-glucopiranosose são do tipo α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 4,6). Na madeira de *E. globulus* as glucanas aparecem em segundo lugar quanto ao teor de hemiceluloses onde 4-5% do peso da madeira é representado por α -glucanas; cerca de 80% são ramificadas

na posição *O*-6 da glucana α -(1 \rightarrow 4) (amilopectinas) e cerca de 20% são lineares α -(1 \rightarrow 4) (amilose) (5, 16). Tipicamente as α -glucanas são solúveis em soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5M a temperaturas compreendidas entre 90 °C e 100 °C (5).

1.1.3.3. Mananas

A cadeia principal das mananas é variável, podendo apresentar substituintes e graus de substituição distintos. Formam-se então diferentes tipos de mananas exemplificadas na Figura 7 (12):

- Galactomananas: cadeia principal constituída por unidades de D-manopirranose com ligações β (1 \rightarrow 4) substituída na posição 6 por unidades α -D-galactopirranose, apresentando graus de substituição diferentes diretamente proporcionais à sua solubilidade em água;
- Glucomananas e (D-galacto)-glucomananas: cadeia principal constituída por unidades de D-manopirranose e D-glicopirranose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4). A razão molar entre as duas pirranoses depende da espécie de árvore. Nas (D-galacto)-glucomananas encontram-se também unidades D-galactopirranose que se ligam na posição 6 das D-manopirranoses apresentando um teor de galactose superior a 15%.

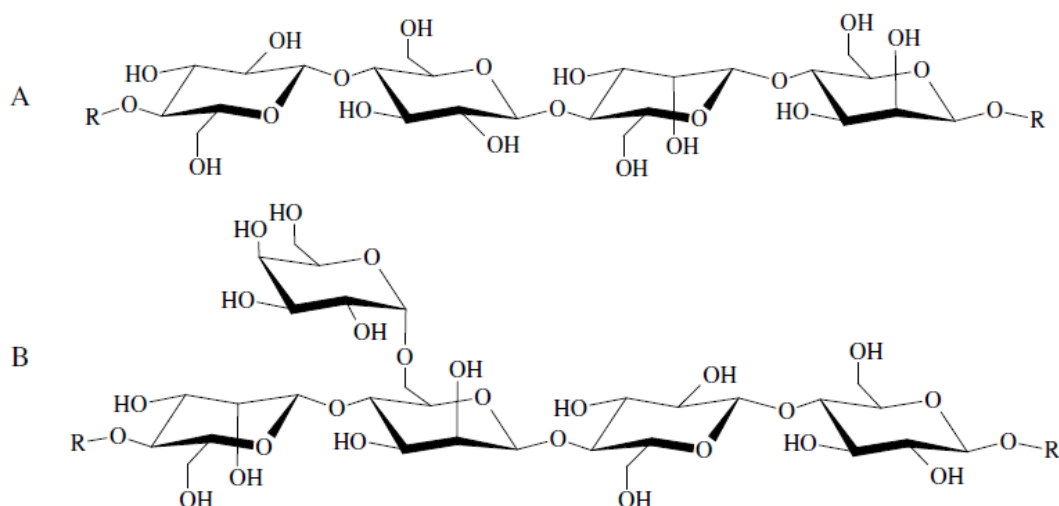


Figura 7: Estrutura em cadeia das glucomananas: D – gluco – D – manana (A); (D – galacto) – D – gluco – D – manana (B) (12).

Na madeira de *E. globulus*, as glucomananas são a família de hemiceluloses que existe em menor quantidade, entre 1% e 3%. A cadeia principal é constituída por ligações β (1 \rightarrow 4) entre unidades β -D-glucopirranose e β -D-manopirranose na proporção molar de 1:1,3. As glucomananas são facilmente extraídas da madeira com soluções alcalinas 14-17% NaOH (5).

1.1.3.4. Galactanas

As galactanas mais conhecidas são as arabinogalactanas que são, por vezes, também designadas por pectinas. A cadeia linear principal deste tipo de hemicelulose é constituída por unidades β (1 \rightarrow 3)-D-galactopirranose e apresenta frequentemente, através de ligações β (1 \rightarrow 6), ramificações de unidades de galactopirranose e L-arabinofuranose (12).

Existe ainda muito pouca informação sobre as galactanas (Figura 8) da madeira de *E. globulus*. O seu teor é diminuto (1-2%) para além de se associar fortemente a outros componentes macromoleculares dificultando o seu isolamento e consequente caracterização estrutural (5).

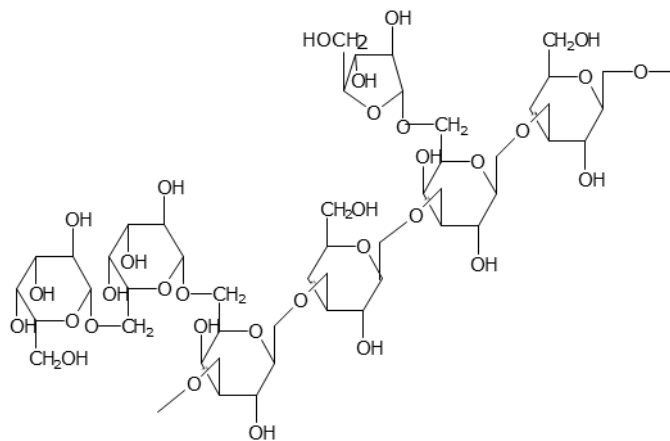


Figura 8: Estrutura em anel de uma galactana (17)

1.1.4. Componentes extractáveis

Para além da celulose, lenhina e hemiceluloses, a estrutura da madeira tem na sua constituição um conjunto de componentes orgânicos que podem ser extraídos por solventes como o etanol, acetona e o diclorometano. Estes componentes são designados

por “Extratáveis” e encontram-se maioritariamente fora da parede celular (na casca e nas raízes das árvores) (10, 18, 19).

Os extractáveis são componentes de baixo peso molecular e, apesar de representarem apenas 1-5% do peso da madeira, desempenham um papel importante na protecção das árvores relativamente a alguns fungos e insectos (18, 19).

Os extractáveis dividem-se em três classes de compostos (18): os aromáticos (responsáveis pela cor de diversas madeiras), os terpénicos (responsáveis pelo odor das madeiras) e os alifáticos (gorduras, ceras e açúcares) (19).

Os extractáveis do *E. globulus* representam entre 1,6% e 1,8% da matéria da madeira (5).

1.1.5. Compostos inorgânicos (Cinzas)

Para além dos constituintes principais da estrutura da madeira e dos extractáveis existe ainda uma quantidade inferior a 1% de um outro tipo de componentes designados por “Compostos inorgânicos” (5).

Estes compostos são quantificados como cinzas e a sua constituição (principalmente sulfatos, fosfatos, silicatos, oxalatos e carbonatos de cálcio, potássio e magnésio) é condicionada pela composição dos solos e pelas condições climáticas (20). No *E. globulus*, as cinzas representam cerca de 0,17% da matéria da madeira (5).

1.2. Química do cozimento kraft e do branqueamento

O processamento da madeira com vista à produção de pasta celulósica branca resume-se de forma simplista em dois estágios: cozimento e branqueamento. O objetivo principal do cozimento passa pela separação das fibras celulósicas e eliminação da maior parte da lenhina (deslenhificação), seguida do branqueamento em que a lenhina residual e outras estruturas cromóforas são removidas e/ou descoloradas.

Para obter pasta celulósica branca podem ser efectuados processos químicos, mecânicos e mistos (21). Os principais processos são ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4: Processos de obtenção da pasta celulósica (adaptado, 21).

| Químicos | | | Mecânicos | Mistos |
|-----------------|---------|------------|----------------|----------------|
| Alcalino | Neutro | Ácido | | |
| Soda | Sulfito | Sulfito | Mecânico | Químico |
| Sulfato (Kraft) | | Bissulfito | Termo-Mecânico | Termo-Mecânico |
| Sulfito | | | | Semi-Químico |

O rendimento do processo do cozimento da madeira é variável, conforme o processo seja mecânico ou químico; os processos mecânicos apresentam rendimentos da ordem dos 95%, enquanto os químicos apresentam rendimentos de cerca de 50% (21).

Os processos químicos podem ser ácidos ou alcalinos e incluem diferentes agentes activos no cozimento. O processo químico ácido é denominado por “processo ao sulfito” (ião bissulfito como agente activo), o alcalino é “processo à soda” (NaOH como agente activo) ou “processo ao sulfato”/kraft (hidróxido e sulfureto de sódio como agentes activos) (21).

A deslenhificação da madeira do *E. globulus* e o branqueamento das suas pastas kraft apresentam um menor consumo de reagentes (1, 5). Por exemplo, para uma brancura ISO de 90%, o rendimento é de 55,6% com consumo de 4,4% de Dióxido de Cloro (ClO₂) comparado com um rendimento de 49,8% com 7,2% de ClO₂ consumido para pasta celulósica kraft oriunda da madeira da *B. pendula*. Aquele maior rendimento não se explica apenas pelo baixo teor de lenhina e consequente facilidade na sua remoção da madeira do *E. globulus*, mas também devido à retenção nas pastas de celulose e xilanas (5).

1.2.1. Cozimento kraft

Os processos mais usados na produção de pasta de papel são o *kraft* (85-90%) e *soda* (10-15%) (2, 19, 22, 23). Na indústria portuguesa em particular, o cozimento kraft

(palavra kraft tem origem alemã e significa “forte” – resistência) (9) é o processo mais usado para o processamento de pasta química para papel. No processo químico kraft, usado para diferentes madeiras, os reagentes usados são recuperados e os tempos de cozimento são curtos quando comparados com os outros processos, sendo realizado actualmente com maior frequência na indústria em digestores contínuos.

Estes digestores eliminaram quase totalmente os tempos mortos verificados nos antigos digestores descontínuos, acrescentando uma grande eficiência neste tipo de cozimento químico. Os parâmetros no processo kraft resumem-se à deslenhificação das aparas da madeira com soluções aquosas de NaOH e Sulfureto de Sódio (Na₂S) (licor negro) por um período de 1-2 horas, sob temperaturas compreendidas entre os 140-170 °C, pressões no intervalo de 7-12 bar (19, 24) e pH entre 12-14 (2) que facilita a penetração dos iões sulfato formados nas fibras, promovendo a sua desintegração e dissolução parcial dos polissacarídeos.

O sulfureto de sódio hidrolisa em solução aquosa segundo a seguinte reação reversível:



Os reagentes activos do licor negro são os iões hidróxido (OH⁻) e hidrogenosulfureto (HS⁻) que são obtidos através das seguintes reações químicas (23):



No processo de cozimento kraft do *E. globulus* a deslenhificação ocorre, ao longo do tempo, em três estágios (6, 25):

- Estágio inicial, coincidente com o período de aquecimento do reactor, onde ocorre uma taxa de deslenhificação compreendida entre os 20% e os 30%;

- Segundo estágio, também considerado o estágio principal onde ocorre a maior taxa de remoção da lenhina (da ordem dos 90%) a temperaturas compreendidas entre os 140°C e os 150°C;

- Terceiro estágio com uma taxa de remoção residual de lenhina.

As condições alcalinas severas do cozimento kraft levam a uma degradação e dissolução final de 90-95% de lenhina no designado licor negro, sendo as fibras da madeira nesta fase compostas principalmente por celulose e hemiceluloses (6, 25).

No estágio inicial da deslenhificação, caracterizado por uma menor selectividade, ocorre também a degradação parcial da celulose, hemiceluloses e pectinas. Esta degradação e conversão em derivados com menor peso molecular ou dissolução no licor negro ocorre pela acção da hidrólise alcalina e pela β -eliminação do terminal redutor da lenhina (reação de *peeling* ilustrada na Figura 9 (21).

Durante o cozimento kraft a celulose apresenta uma maior resistência ao ataque alcalino, sendo menos degradada que as hemiceluloses. O segundo estágio é caracterizado pela clivagem aleatória das ligações glicosídicas dos polissacarídeos promovido pela hidrólise alcalina e pelas reacções de *stopping* ilustradas também na Figura 9. O terceiro e último estágio é caracterizado por uma maior degradação da celulose e uma remoção da lenhina residual da pasta (4, 26).

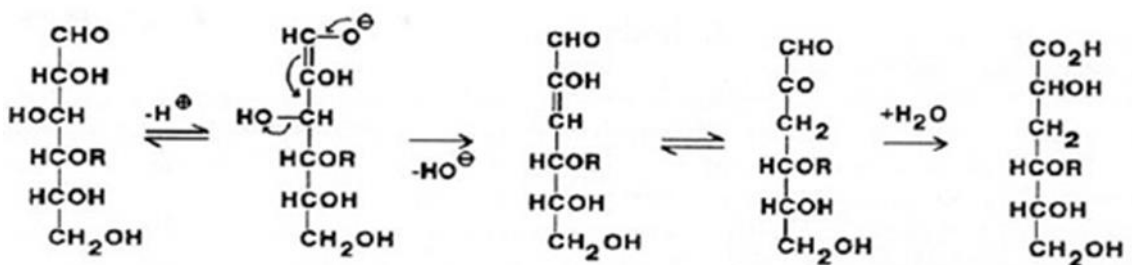


Figura 9: Representação esquemática das reacções de *peeling* e de *stopping* (21).

O produto obtido do cozimento kraft, sob a forma duma pasta crua acastanhada, é constituído por celulose, uma fracção das hemiceluloses iniciais e lenhina residual com teores compreendidos entre 1% e 5%. A lenhina residual tem presentes grupos

cromóforos e não é removida, mesmo que o tempo de cozimento seja alargado, representando uma desvantagem deste processo. A pasta apresenta uma elevada resistência fibrilar, enquanto o efluente resultante da degradação e solubilização dos componentes da madeira é rico em lenhina residual e componentes inorgânicos, sendo chamado licor negro. Depois de lavada e crivada, a pasta crua de cor acastanhada segue para o estágio do branqueamento.

1.2.2. Branqueamento

O branqueamento das pastas cruas obtidas quer por processos químicos, quer mecânicos, confere um acréscimo do grau de brancura através da remoção da lenhina residual e/ou oxidação dos grupos cromóforos remanescentes (21). Os agentes químicos usados no branqueamento são diversos, mas todos com duas características comuns: fortemente oxidantes e com efeitos no comprimento das moléculas de celulose e consequente resistência das fibras.

O Cloro elementar (Cl_2) foi o primeiro agente químico de branqueamento a ser usado, pois é muito seletivo na remoção da lenhina. No entanto, desde os anos '90, que têm vindo a surgir alternativas mais ecológicas e que se podem dividir em dois tipos (21):

- *ECF* – (*Elemental Chlorine Free*): Cloro elementar substituído por Hipoclorito de Sódio e Dióxido de Cloro;
- *TCF* - (*Total Chlorine Free*): não se aplica qualquer forma de Cloro. Os agentes químicos usados são Oxigénio, Peróxido de Hidrogénio, Ozono.

O tipo de branqueamento *ECF* é processado através da remoção da maior parte da lenhina residual das pastas e é aplicado em pastas químicas que apresentam no final um elevado nível de brancura. No processo *TCF* a lenhina não é removida e por isso as pastas são moderadamente brancas, tornando-se aplicável em pastas semi-químicas, químico-mecânicas e mecânicas.

A nível industrial, com vista à optimização/rentabilização do processo de branqueamento (maior brancura das pastas com recurso a baixo consumo de reagentes e utilização eficiente dos equipamentos disponíveis), são combinados, em vários estágios/seqüências, diferentes reagentes para a deslenhificação e branqueamento em

simultâneo. Para pastas kraft de eucalipto as sequências mais utilizadas são do tipo *ECF*.

1.3. Química da pasta celulósica kraft do *E. globulus*

A pasta celulósica kraft é o produto obtido do cozimento kraft. As pastas celulósicas kraft do *E. globulus* são constituídas por celulose, hemiceluloses, lenhina residual e extractáveis, tendo a sua análise e caracterização sido objecto de vários estudos (6, 26). O conhecimento da sua composição química é muito importante para a compreensão das alterações verificadas química e estruturalmente após a extração das hemiceluloses (maioritariamente xilanas) em meio alcalino, um dos objetivos principais deste trabalho. A composição química da pasta celulósica kraft branca do *E. globulus*, dos monossacarídeos neutros da pasta celulósica crúa e branca kraft do *E. globulus* é apresentada nas Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7.

Tabela 5: Composição química da pasta celulósica kraft branca do *E. globulus*, % em peso (adaptado, 6, 26).

| Componentes | % em peso p/p (w/w) |
|----------------------------|---------------------|
| Lenhina residual | 0,33 |
| Celulose | 80-85 |
| Hemiceluloses (xilanas) | 14-19 |
| Extractáveis (com Acetona) | 0,37 |

Tabela 6: Composição química dos monossacarídeos neutros da pasta celulósica crúa kraft do *E. globulus* (adaptado, 6).

| Monossacarídeos Neutros | % |
|-------------------------|------|
| Glc | 45,0 |
| Xyl | 10,6 |
| Rha | 0,1 |
| Ara | 0,1 |
| Man | 0,1 |
| Gal | 0,4 |

Tabela 7: Composição química dos monossacarídeos neutros da pasta celulósica kraft branca do *E. globulus* (adaptado, 26).

| Monossacarídeos Neutros | % |
|-------------------------|------|
| Glc | 82,9 |
| Xyl | 16,2 |
| Rha | 0,3 |
| Ara | 0,1 |
| Man | 0,2 |
| Gal | 0,3 |

1.3.1. Celulose

A reactividade química da celulose na pasta celulósica kraft branca do *E. globulus*, (representando a celulose cerca de 80-85% p/p da pasta) (25), é afectada pela sua estrutura supramolecular, sendo geralmente aceite que as regiões amorfas, quando comparadas às cristalinas, são mais facilmente penetradas pelos reagentes químicos do cozimento e do branqueamento (1).

A celulose é resistente ao ataque alcalino característico do cozimento kraft, no entanto, a alcalinidade do meio provoca também a sua degradação parcial e conversão em derivados com menor peso molecular dissolvidos no licor negro. O peso molecular da celulose da pasta é menor que o peso molecular da madeira nativa de qualquer espécie. O grau de polimerização da celulose decresce com o cozimento; é da ordem de 1000-3000 na pasta, enquanto que na madeira oscila entre os 5000-10000 (20). Nas pastas kraft cruas do *E. globulus* varia entre 2200 e 2500 (2).

Depois do cozimento, na solução fortemente alcalina, aumenta a distorção da célula unitária monoclinica da celulose, convertendo-se parcialmente o polimorfo Celulose I em Celulose II. O grau de cristalinidade da celulose do *E. globulus* aumenta após o cozimento, passando de 68%, da celulose nativa desta madeira, para 74%. Este aumento do grau de cristalinidade resulta da dissolução/degradação das regiões amorfas da celulose. Contudo, não existem estudos que comprovem a correlação entre o grau de cristalinidade da celulose e a sua estabilidade relativa durante o processo kraft. A presença de amido e outras glucanas na madeira, mesmo em pequenas quantidades,

“mascaram” o real teor da celulose na madeira e dificultam a interpretação da sua análise quantitativa na pasta celulósica (1).

1.3.2. Hemiceluloses

No estágio inicial do cozimento kraft, as principais perdas de polissacarídeos devem-se à eliminação de glucose atribuídas a polissacarídeos do tipo glucana e não à dissolução das xilanas que, sabe-se já, são eliminadas gradualmente ao longo do cozimento (2). A alcalinidade do meio provoca a remoção dos grupos acetilo constituintes das glucuronoxilanas (4). As xilanas apresentam sempre um grau de retenção na pasta superior a 50% (2). Este elevado grau de retenção é explicado, em parte, pelo elevado peso molecular relativo destas xilanas e também pela sua associação estrutural a outros polissacarídeos na parede celular (2, 5). Uma fracção notável das unidades de ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico (MeGlcA) das xilanas da madeira do *E. globulus* resiste ao cozimento kraft. A ramificação destas xilanas na posição *O*-2 com cadeias de glucanas e ramnoarabinogalactanas contribuem para a sua elevada retenção nas pastas celulósicas (5) fazendo com que estes grupos contribuam para a elevada estabilidade das xilanas nas pastas (1).

Durante o cozimento kraft, parte do ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico (MeGlcA) sofre β -eliminação na posição *O*-4, com libertação de metanol, formando-se o ácido hexenurónico (HexA) (Figura 10), cujo teor aumenta no decorrer do cozimento, podendo diminuir no estágio final caso o meio se mantenha com um grau de alcalinidade suficiente. Este comportamento deve-se provavelmente às condições mais suaves do cozimento kraft do *E. globulus* e não tanto à estrutura peculiar das glucuronoxilanas daquela espécie (27). No final do cozimento, o teor de HexA é cerca de 30% dos ácidos urónicos totais na pasta (2,8%). Cerca de 55% dos grupos de ácido urónico são degradados ou eliminados das cadeias de xilana remanescente na pasta., sendo o MeGlc_pA terminal (forma piranosilo do MeGlcA) mais lábil do que o correspondente ácido substituído em *O*-2 (2).

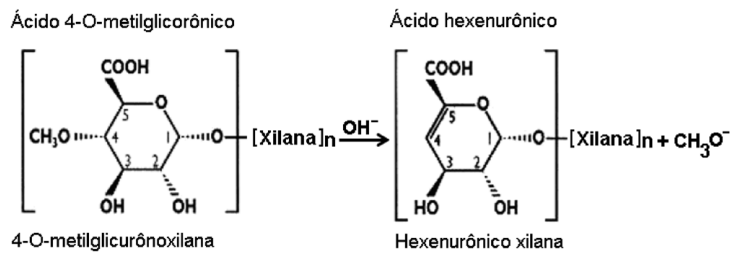


Figura 10: Conversão do MeGlcA em Ácidos Hexenurônicos durante o cozimento kraft.

As proporções de perda dos polissacarídeos nos diferentes estágios do cozimento dependem do tipo de processo de deslenhificação. Estão, contudo, definidas as reações responsáveis: reações de *peeling* dos grupos terminais redutores e a hidrólise alcalina das ligações glicosídicas e dos grupos acetilo. A reação de *peeling* contribui para a forte despolimerização das hemiceluloses (20, 25); depois do cozimento, a massa molecular ponderada (M_w) das xilanas isoladas das pastas do *E. globulus* decresce para cerca de metade (16297 Da ao fim de 120 min. de cozimento, relativamente a 30516 Da no início; M_w das xilanas extraídas com dimetilsulfóxido) (2).

A contribuição das unidades de ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurônico (MeGlcA) para o elevado rendimento das pastas kraft do *E. globulus* é ainda difícil de estimar, pois, se por um lado, estes fragmentos podem substituir as unidades de xilopiranosose na posição *O*-2 prevenindo a isomerização do terminal redutor e retardando a reação de *peeling*, por outro lado o elevado grau de ramificação com estes fragmentos pode ter um efeito contrário à retenção das xilanas. Este efeito acontece devido à elevada solubilidade e consequente dissolução directa no licor negro das xilanas muito ramificadas (número de substituintes ácido metilglucurônico/100 unidades de xilose que nas espécies da madeira de *Eucalyptus* se situa no intervalo 25-35%, apesar de após o cozimento kraft este grau de ramificação baixar para os 1-4%) (20).

1.3.3. Lenhina residual

Os parâmetros particulares da estrutura da lenhina residual da pasta celulósica kraft do *E. globulus* são: elevados níveis de unidades derivadas do seringilpropano – S; um teor invulgarmente elevado de estruturas β -*O*-4 por unidade de fenilpropano que contribuem

para uma proporção elevada de unidades não-condensadas:unidades condensadas e consequente grau de condensação baixo (2, 5). Estes três parâmetros facilitam a reação de oxidação com o agente branqueador dióxido de cloro (ClO_2), favorecendo o branqueamento *ECF* das pastas kraft (5).

Devido à presença dos dois grupos metoxílicos nas posições 3 e 5 dos núcleos aromáticos das unidades derivadas do seringilpropano – S, estas caracterizam-se por uma maior reactividade nos processos de cozimento e branqueamento comparativamente às unidades derivadas do guaiacilpropano – G. Em contrapartida, a presença do grupo metoxílico na posição 5 do anel aromático da unidade S prejudica a reação de condensação da lenhina nestes processos (2, 5).

Apesar da baixa proporção de estruturas condensadas na lenhina residual, o grau de condensação da lenhina residual remanescente na pasta vai aumentando, ao longo do cozimento, relativamente à lenhina na madeira; este parâmetro é confirmado pelo aumento do teor das estruturas α -5', 5-5' e 4-O-5'. Nesta mesma fase é iniciada a clivagem das ligações β -O-4, onde as unidades S da lenhina são removidas, levando à diminuição do seu peso molecular. A ligação covalente que aquelas unidades estabelecem com as xilanas, igualmente dissolvidas e degradadas, levam à diminuição da razão S/G no licor negro comparativamente à lenhina na madeira (28). As proporções aproximadas dos monómeros S:G:H da lenhina residual da pasta passam a ser, respetivamente 60:35:5 (1).

1.3.4. Componentes Extractáveis

A pasta celulósica tem também na sua constituição um conjunto de componentes orgânicos oriundos da casca das aparas da madeira que podem ser extraídos por solventes como a acetona e, tal como na química da madeira, estes componentes são designados por “Extractáveis” (26).

Os extractáveis presentes nas pastas celulósicas kraft brancas das espécies de eucalipto, extraídos com acetona, são constituídos por 33-42% de extractáveis lipofílicos voláteis

e restante proporção de extractáveis lipofílicos não-voláteis. Dos extractáveis lipofílicos voláteis, os principais são ácidos gordos, esteróis e álcoois alifáticos. Nas pastas celulósicas kraft brancas do *E. globulus*, 0,61 mg/g pasta *o.d.* (“oven dried” – base seca) são ácidos gordos; 0,28 mg/g pasta *o.d.* são esteróis e 0,05 mg/g pasta *o.d.* são álcoois alifáticos (26). Estes compostos orgânicos são componentes de baixo peso molecular que representam cerca de 0,37% do peso seco da pasta celulósica kraft branca do *E. globulus*, calculados após extração com acetona (26).

1.4. Métodos de isolamento das xilanas da madeira e da pasta celulósica

Para o isolamento das xilanas há várias metodologias que, dependendo das matérias em estudo, podem ser realizadas em diferentes fases do processo (29):

- A partir da madeira;
- A partir do licor negro do cozimento. Neste caso há, contudo, a necessidade de inúmeros passos de purificação para remover a lenhina e outras contaminações;
- A partir de pasta crua ou branca, fase que resulta no isolamento de xilanas com maior grau de pureza (29).

As metodologias adoptadas para o isolamento das xilanas são tipicamente por extração alcalina e/ou com solventes orgânicos, dos quais o mais frequentemente usado e descrito na literatura é o dimetil sulfóxido (DMSO). Na extração alcalina das xilanas, os substituintes acetílicos nativos da sua estrutura são clivados, afetando a sua solubilidade. Por outro lado, a extração com solventes orgânicos preserva, tanto quanto possível, a estrutura original da xilana, o que permite obter informação adicional acerca da sua estrutura, nomeadamente, a abundância relativa e a localização dos fragmentos *O*-acetílicos na cadeia principal (30). Os rendimentos apresentados em cada uma das metodologias são, por isso, diferentes; o rendimento da extração com solventes orgânicos é inferior à extração alcalina (13, 30). Para o caso particular da extração das xilanas da holocelulose da *A. mangium* os rendimentos são da ordem dos 50-55% (30).

Para o isolamento das xilanas, por extração alcalina ou com solventes orgânicos, da madeira de qualquer espécie de árvore é obtida, em primeiro lugar, a holocelulose através da deslenhificação. Esta deslenhificação é feita de acordo com um de dois

métodos: “método peracético” ou “método clorito” que, dependendo do tipo de extração, apresentam rendimentos diferentes. Por exemplo, o rendimento do isolamento das xilanas da madeira do *E. globulus* por extração com DMSO a partir do “método peracético” é cinco vezes superior ao do “método clorito” (46% e 10%, respetivamente) (31).

A deslenhificação elevada das pastas kraft brancas das folhosas (por exemplo bétula e eucalipto), bem como a proporção residual de mananas na sua constituição, facilita a extração e o isolamento de xilanas puras, sendo desnecessário qualquer pré-tratamento químico às pastas kraft brancas (13).

1.4.1. Isolamento das xilanas por extração alcalina

1.4.1.1. Isolamento das xilanas por extração alcalina a partir da madeira

O isolamento da heteroxilana da madeira do *E. globulus* por extração alcalina foi já estudado (14). Em primeiro lugar foi obtida a holocelulose após a pré-extração da madeira com uma solução etanol-tolueno. Esta holocelulose foi deslenhificada através do método clorito modificado (32).

A heteroxilana foi extraída da holocelulose, previamente lavada e seca, com solução de hidróxido de potássio (KOH). A heteroxilana foi recuperada a partir desta solução alcalina através de uma precipitação etanólica (adição de etanol absoluto) após acidificação com ácido acético (CH₃COOH). No final o precipitado de xilana é isolado por centrifugação (14).

Um estudo recente (32) descreve a extração alcalina das hemiceluloses da madeira da *O. europea*. A holocelulose foi obtida através da deslenhificação da madeira com clorito de sódio em meio acidificado com ácido acético a uma temperatura e tempo definidos. O resíduo sólido foi filtrado e seco depois de lavado com H₂O até à sua neutralização. A holocelulose foi extraída, à temperatura ambiente, com solução de KOH 10% com ácido bórico (H₃BO₃) 1% com um tempo também definido. Para a extração foi determinado também previamente o rácio sólido: solução. O filtrado foi “neutralizado” com ácido acético 6 M e depois concentrado sobre pressão reduzida. Com vista à posterior

caracterização estrutural das hemiceluloses, a fracção hemicelulósica do precipitado foi isolada por centrifugação, enquanto o sobrenadante foi subfraccionado através de precipitações etanólicas consecutivas e sequenciais com diferentes concentrações de etanol. Todas as subfracções foram dialisadas com H₂O destilada e liofilizadas (32).

1.4.1.2. Isolamento das xilanas por extração alcalina a partir da pasta celulósica branca

Um estudo da extração alcalina das xilanas com diferentes concentrações de hidróxido de sódio (NaOH) foi levado a cabo com pasta kraft branca de bétula com uma consistência definida, numa atmosfera de azoto gasoso (N₂) e à temperatura ambiente. Após a extração, a pasta celulósica foi filtrada e o filtrado precipitado por decréscimo de pH através da adição de ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) ou dióxido de carbono (CO₂). Nestas condições, as xilanas precipitaram sob a forma duma solução leitosa esbranquiçada. Nesta solução leitosa e, tal como esperado, o teor de sais foi superior quando usados os ácidos inorgânicos comparativamente ao CO₂. Os sais foram removidos do precipitado através de diálise, a qual não afecta a distribuição da massa molar das xilanas (29, 33). No isolamento destas xilanas, uma forma de evitar a formação de sais, passa pela recuperação do extractável alcalino de NaOH através da combinação das técnicas ultrafiltração e diafiltração. Estas técnicas são mais selectivas que a precipitação ácida, pois são usadas membranas específicas que levam ao isolamento de substâncias com a mesma massa molar (29). Na literatura encontra-se uma breve descrição da extração alcalina da pasta da madeira do *E. globulus* (previamente dispersa em água), em atmosfera de N₂, com solução de KOH e uma pequena percentagem de borohidreto de sódio (NaBH₄) (34). Nesse trabalho a pasta extraída foi lavada com água destilada até à sua neutralização. Num outro estudo que pretendeu isolar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos dissolvidos no licor negro do cozimento kraft do *E. globulus*, as xilanas das pastas foram também tratadas com os mesmos reagentes e condições; nesse trabalho, a solução alcalina foi filtrada, separando a pasta das xilanas dissolvidas. A pasta extraída foi lavada com uma solução de KOH e H₂O e as xilanas foram posteriormente precipitadas, sob agitação, através da acidificação com ácido acético glacial, seguido da adição de etanol até perfazer um volume definido. Depois da total precipitação e da aspiração da maior parte do sobrenadante, a mistura foi centrifugada. Para finalizar o processo, as xilanas foram

lavadas com metanol absoluto e secas sob vácuo e pentóxido de fósforo. O rendimento desta extração oscilou entre os 60% e os 80% (25).

Um outro estudo da extração das xilanas comparou a extração alcalina (soluções de KOH e NaOH) com a extração com nitreno (13). Este estudo comparativo foi realizado com quatro tipos de pastas celulósicas oriundas de quatro tipos de madeira diferentes: eucalipto, faia, bétula e mistura de resinosas. Os vários passos da extração estão representados na Figura 11. As pastas foram previamente desintegradas em água, centrifugadas e climatizadas e a extração decorreu a uma temperatura controlada e com um tempo definido. Os extractos foram separados das pastas através de filtração sob vácuo. As pastas alcalinas foram lavadas com água e ácido acético, enquanto que as pastas da extração com nitreno foram lavadas com ácido láctico. As perdas inerentes à recuperação dos extractos (precipitação, lavagem e secagem do precipitado) são superiores na extração com nitreno, pois o procedimento envolve centrifugações e decantações repetidas, resultando em rendimentos da extração nitreno inferiores aos da extração alcalina.

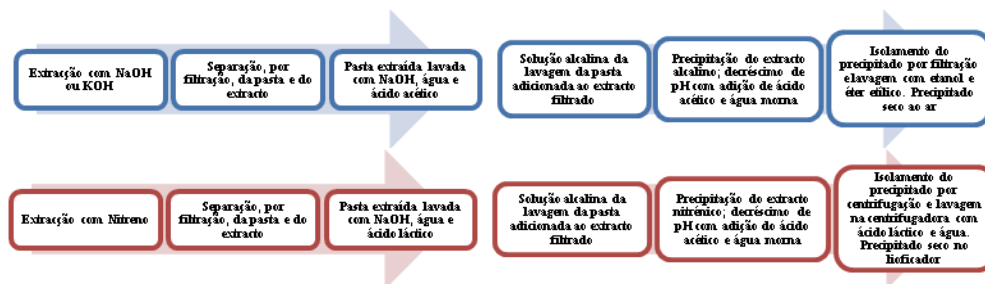


Figura 11: Comparação do processo de isolamento das xilanas de pastas celulósicas de diferentes madeiras através da extração alcalina e da extração com nitreno (adaptado, 13)

1.4.2. Isolamento das xilanas por extração com solventes orgânicos

1.4.2.1. Isolamento das xilanas por extração com solventes orgânicos a partir da madeira

Para o estudo e caracterização do isolamento da heteroxilana das madeiras das *P. elongata*, *P. fortunei* e *A. sisalana* foi obtida em primeiro lugar a holocelulose destas madeiras. A holocelulose obteve-se através da deslenhificação com ácido peracético seguindo um perfil de tempo e temperatura controlado e definido. Depois da deslenhificação, a holocelulose foi filtrada com um filtro de placa porosa, lavada com acetona e água quente, seguida de secagem à temperatura ambiente. A metodologia de

isolamento da heteroxilana realizada nestes estudos passou por duas extracções consecutivas com DMSO a temperatura controlada, sob agitação contínua, seguida duma precipitação do filtrado com EtOH:MeOH:H₂O (7:2:1) previamente acidificado com ácido fórmico (HCOOH). A heteroxilana foi isolada através de centrifugação, lavada com MeOH anidro e seca sob vácuo à temperatura ambiente (35, 36).

O isolamento da heteroxilana da madeira do *E. globulus* por extração com o solvente orgânico DMSO foi também já estudado e caracterizado. Em primeiro lugar, foi obtida a holocelulose através da deslenhificação com ácido peracético a uma temperatura e tempo definidos e sob agitação constante. Posteriormente, a holocelulose foi seca à temperatura ambiente e filtrada com um funil de placa porosa após lavagens sucessivas com água morna e solução de C₃H₆O-EtOH (1:1). A heteroxilana acidificada foi isolada da holocelulose através da extração com DMSO em atmosfera de N₂ gasoso, sob agitação, e a uma temperatura e tempo controlados. Depois da extração, a holocelulose residual insolúvel foi filtrada também com um filtro de placa porosa e lavada com uma solução de DMSO:água destilada. O extracto da heteroxilana foi precipitado com uma solução de EtOH:MeOH: H₂O acidificado com ácido fórmico. Depois da precipitação completa da heteroxilana, a mesma foi centrifugada, lavada várias vezes com MeOH e seca à temperatura ambiente sob pressão reduzida (6).

1.5. Aplicação das xilanas para fins não papeleiros

Devido ao aumento do preço dos produtos petroquímicos e à crescente preocupação com as questões ambientais e sociais tem sido dada muita atenção, nos últimos anos, ao desenvolvimento de materiais a partir de polímeros naturais para diferentes aplicações industriais (33). As atenções acabaram por virar-se para os polissacarídeos não alimentares, tais como a celulose e as hemiceluloses, tal o conflito social que coexiste com a aplicação de derivados químicos de amido, base da alimentação de milhões de pessoas. As hemiceluloses são o segundo material mais abundante em qualquer planta. O crescimento anual da madeira e outras biomatérias-primas é de cerca 170-200 biliões de toneladas onde em média 40-50% são de celulose e 20-35% são hemiceluloses o que significa 35-70 biliões de toneladas disponíveis. Esta disponibilidade é, nos últimos anos, vista numa perspectiva inovadora relativamente às designadas aplicações

convencionais que têm sido essencialmente a sua conversão em furfural e xilitol (das xilanas por exemplo) (29, 33). Devido à elevada pureza e brancura das xilanas isoladas através da extração alcalina têm sido estudadas utilizações industriais alternativas às convencionais. A partir da sua modificação química, múltiplas funções podem ser introduzidas na cadeia polimérica (Figura 12) (37).

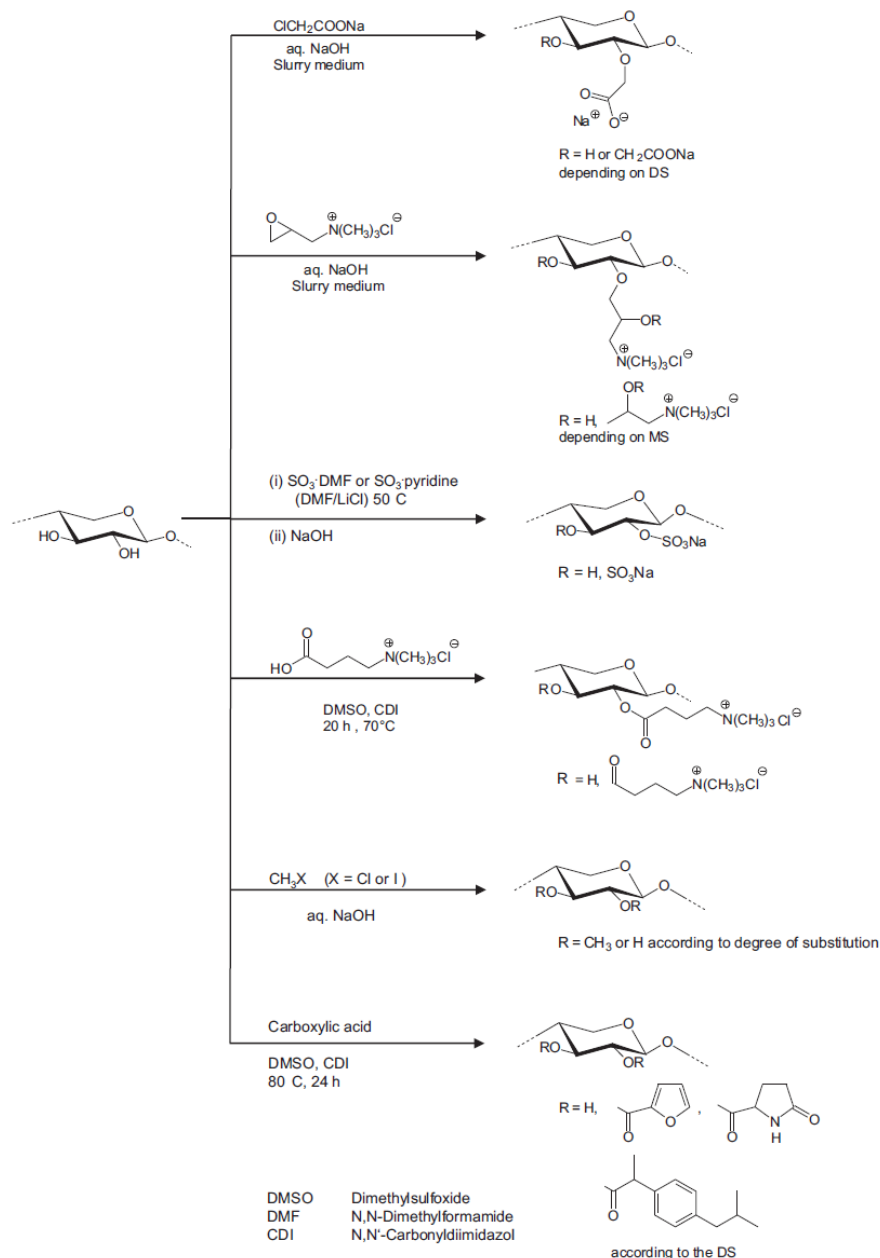


Figura 12: Exemplos de preparação de derivados de xilanas via eterificação em soluções aquosas ou esterificação em DMF/LiCl DMSO (37).

Dependendo do Grau de Substituição (DS) e da distribuição dos substituintes, os derivados das xilanas apresentam propriedades diferentes o que leva a um leque

diferenciado de possíveis aplicações a explorar em áreas tão distintas como sistemas de embalagens alimentares, revestimento para papel *offset*, hidrogéis, nutrição, cosmética e farmacêutica (29, 33, 37).

O teor de xilanas obtido por extração e/ou redeposição na pasta branca kraft é distinto, sendo estudadas aplicações alternativas ao fabrico do papel “tradicional” (Figura 13). Por um lado a reengenharia das fibras afecta as propriedades do papel produzido a partir da pasta com xilana extraída; por outro a aplicação das xilanas puras na indústria de produtos químicos para fabricação de papel, nas indústrias cosmética, médica e alimentar (29).

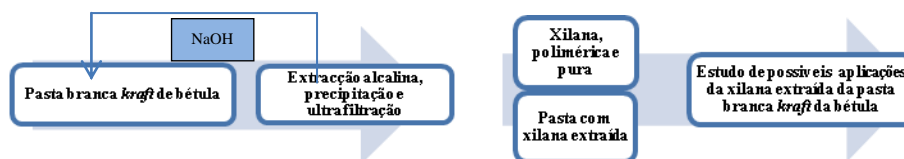


Figura 13: Possíveis aplicações a partir da extração da xilana a partir da pasta branca kraft da bétula (adaptado, 29).

1.5.1. Sistemas de embalagens indústria alimentar

A procura crescente por bio-materiais para embalagens, recicláveis e alternativos às películas de retenção existentes (ainda) maioritariamente, tais como alumínio e polímeros sintéticos não renováveis deve-se a questões ambientais.

Os polissacarídeos possuem geralmente a capacidade de formar película. Recentemente a uma glucuronoxilana isolada da madeira de faia foi atribuída a sua capacidade de formar película de retenção. Com a correta modificação e/ou plastificação interna, os derivados das xilanas ficam aptos a evitar as limitações da plastificação externa (migração e envelhecimento) (33). Para as películas de retenção nas embalagens alimentares, são de particular interesse as propriedades relacionadas com a permeabilidade ao Oxigénio, vapor de água e gorduras, sendo que nos estudos recentes, os derivados das xilanas solúveis apresentam os melhores valores para estas propriedades (33).

Os derivados das xilanas têm demonstrado boas propriedades como “agentes de barreira”. A melhor permeabilidade ao Oxigênio encontrada numa hidroxipropil-xilana foi cerca de um terço da registada no polímero sintético de referência (polietileno tereftalato), tal como a permeabilidade ao vapor de água ser cerca de 50-100% da medida num biopolímero de revestimento comercial. Para além disso os melhores “revestimentos de barreira” mostraram uma baixa migração de óleo mineral (33).

1.5.2. Pigmentos de revestimento para papel *offset*

Os latexes sintéticos e o amido solúvel constituem ainda hoje os pigmentos do papel para *offset*. Neste campo têm sido também estudadas as propriedades dos derivados de xilanas com vista à sua utilização nesta área industrial sob a forma de substituinte daqueles (29).

1.5.3. Farmacêutica e cosmética

A potencial aplicação das xilanas nas indústrias farmacêutica e cosmética tem ganho também um interesse crescente. Os derivados de xilanas obtidos via eterificação em soluções aquosas ou esterificação em DMF/LiCl DMSO apresentaram diferentes propriedades que dependem do grau de substituição e da distribuição dos substituintes na cadeia. Dependendo dos derivados de xilanas em estudo, as aplicações em potencial passam pela sua utilização, por exemplo, como agente antimicrobiano, inibidor da coagulação do sangue (37).

2. Metodologia experimental

A metodologia experimental envolveu três fases:

- i) Definição da concentração de NaOH que apresentou a melhor taxa de remoção de xilanas através da extração alcalina das xilanas da pasta branca kraft de *E. globulus* com soluções de NaOH de diferentes concentrações;
- ii) Definição do tempo de reação de extração com a solução de NaOH que apresentou a melhor taxa de remoção de xilanas;
- iii) Caracterização química e estrutural *a posteriori* das amostras selecionadas de xilanas extraídas em meio alcalino e determinação dos seus pesos moleculares.

Para a definição do perfil da extração alcalina das xilanas da pasta branca kraft de *E. globulus* com soluções de NaOH de diferentes concentrações e para a definição do tempo de reação de extração com a solução de NaOH que apresentou a melhor taxa de remoção de xilanas foram utilizadas as instalações do RAIZ (Instituto de Investigação da Floresta e do Papel), sendo os reagentes e equipamentos cedidos igualmente por aquele Laboratório de Investigação. A caracterização química e estrutural posterior das xilanas extraídas em meio alcalino com diferentes tempos, bem como os seus pesos moleculares foi desenvolvido nos laboratórios tecnológicos do CICECO (Centro de Investigação de Materiais Cerâmicos e Compósitos) da Universidade de Aveiro, sendo aí disponibilizados os necessários reagentes e dada a possibilidade de coordenação de utilização dos equipamentos para a implementação das técnicas instrumentais de análise selecionadas.

A matéria-prima, pasta branca kraft de *E. globulus* (Figura 14), proveniente da fábrica da Portucel de Cacia depois de refinada no RAIZ no refinador, modelo Escher Wiss RL1 até atingir o Grau Shoppler Riegler (SR °) 66° foi filtrada no funil de Buchner com papel de filtro e foram feitas “bolachas de pasta” (denominação vulgar industrialmente) com cerca de 30 g. Estas foram secas na sala climatizada e posteriormente desintegradas/esfareladas a seco no aparelho desintegrador Waring Commercial, Heavy Duty Blender, modelo 24CBTEC.



Figura 14: Matéria-prima - pasta branca kraf do *E. globulus*

2.1. Extração alcalina das xilanas

Para garantir uma consistência de 5%, foram pesados $12,50 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de pasta branca kraft de *E. globulus* (base seca) num frasco de plástico e foi adicionada H_2O destilada até ao peso final de $250,00 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$. A pasta ficou imersa por um período superior a 4 horas e foi posteriormente passada através de um funil de Buchner sem filtro; a pasta retida no funil foi depois lavada com o filtrado. O filtrado foi colocado num copo de vidro e de seguida foram adicionados os reagentes no estado sólido: NaOH, pesado de acordo com a concentração a estudar (Tabela 8) e $0,025 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ Borohidreto de Sódio. A Figura 15 mostra os vários passos descritos.

Tabela 8: Massa de NaOH pesada e concentração de NaOH a estudar para 250 mL de solução e consistência de 5% da pasta.

| m (NaOH), g | [NaOH], % |
|------------------|-----------|
| $10,00 \pm 0,01$ | 4 |
| $12,50 \pm 0,01$ | 5 |
| $15,00 \pm 0,01$ | 6 |
| $20,00 \pm 0,01$ | 8 |
| $25,00 \pm 0,01$ | 10 |
| $30,00 \pm 0,01$ | 12 |
| $35,00 \pm 0,01$ | 14 |

Após a completa dissolução do NaOH no filtrado foi adicionada a pasta que, depois de bem misturada e desintegrada com a “varinha mágica”, foi homogeneizada durante cerca de 15 segundos e colocada no banho termostático a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante. Foi dado início à extração alcalina durante 2 horas. A Figura 15 mostra os vários passos descritos.



Figura 15: Sequência laboratorial simplificada da extração alcalina.

Decorridas as 2 horas de extração alcalina, o material foi filtrado em funil de Buchner com papel de filtro, porosidade 12-15, sob vácuo. Para garantir a interrupção da extração alcalina, a pasta, retida no funil, foi transferida rapidamente para um copo de vidro cheio com água destilada; a pasta foi bem agitada neste meio líquido e voltou a ser filtrada usando o mesmo funil de Buchner e o mesmo papel de filtro. Foi verificado o pH do filtrado com papel indicador e o processo de lavagem para a neutralização foi repetido até a obtenção de um valor de pH igual ou inferior a 7. A pasta sujeita à

extração foi seca em estufa a 60°C para posterior determinação do seu teor de pentosanas pelo método RAIZ descrito à frente.

2.2. Determinação do Teor de Secura

A determinação do Teor de Secura da pasta é importante para o cálculo do rendimento das extracções alcalinas com diferentes concentrações de NaOH e diferentes tempos de reação, bem como para a determinação posterior do Teor de Pentosanas de cada uma das amostras de pasta extraída.

O Teor de Secura das várias amostras de pasta foi determinado baseado no procedimento interno do RAIZ; foi registada a variação gravimétrica das amostras antes e após secagem na estufa a 105±3°C, com pelo menos quatro horas de intervalo de secagem. Foram pesadas inicialmente, em duplicado, 2±0,0001g de cada amostra e após arrefecimento durante um período superior a 30 minutos. O teor de secura (S) foi calculado através da seguinte Equação:

$$S = \frac{\textit{massa}_{\textit{amostra após secagem}}}{\textit{massa}_{\textit{amostra antes secagem}}} * 100$$

2.3. Determinação do Teor de Pentosanas

O Teor de Pentosanas foi determinado baseado no procedimento interno do RAIZ, cujas referências são a Tappi 223 cm, 257 cm e 264 cm.

Foram pesados 2,20±0,01g de pasta que foram transferidos para um balão de destilação de 250 mL; foram adicionados 20,0±0,1g de NaCl (s) e 100 ml de HCl 3,85N. No sistema de destilação foram adicionados lentamente 250 mL de HCl 3,85N através do funil de carga. A destilação terminou quando foram recolhidos 250 mL de destilado para um balão volumétrico imerso em banho de gelo. O balão volumétrico de recolha do destilado foi colocado no banho termostático a 25°C± 1°C e, após estabilização da temperatura, perfez-se o volume com HCl 3,85N.

O destilado foi diluído pipetando-se 5 mL do mesmo para um balão volumétrico de 50 mL e perfazendo novamente o volume com HCl 3,85N. De seguida foram novamente pipetados 5 mL para um novo balão volumétrico de 50 mL e adicionados 25 mL de Orcinol, colocando-se de seguida o balão no banho termostático a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Após esse tempo, perfez-se o volume com etanol e o balão foi colocado novamente no banho termostático a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Procedeu-se imediatamente a seguir à leitura da densidade óptica das amostras a 630 nm no Espectrofotómetro, Thermo Spectronic, Type Helios Alfa.

Foi feito um ensaio em branco com 5 mL de HCl 3,85 N e sujeito aos mesmos procedimentos do destilado.

2.4. Tempo da reação de extração alcalina

Depois de determinado o Teor de Pentosanas das pastas sujeitas a diferentes concentrações de NaOH e para a definição do tempo de extração alcalina foi selecionada a concentração de 10% de solução de NaOH e repetido o procedimento da extração alcalina com diferentes tempos (Tabela 9).

Tabela 9: Tempos estudados para 250 mL de solução e consistência de 5% da pasta.

| Tempos de extração alcalina, h | |
|--------------------------------|------------|
| [NaOH] 5% | [NaOH] 10% |
| 0,5 | 0,5 |
| 1 | 1 |
| 2 | 1,5 |
| 3 | 2 |
| | 3 |

Após cada extração alcalina com diferentes tempos, o material extraído em cada uma foi separado através de filtração, sob vácuo, com funil de placa porosa G1 (ver Figura 16). Para garantir a interrupção da extração alcalina, a pasta, retida na placa, foi introduzida imediatamente após e sob forte agitação num copo de vidro previamente cheio com água destilada. Foi realizado *a posteriori* o procedimento de neutralização da pasta até pH do filtrado igual ou inferior a 7 usando o mesmo funil de placa porosa e com a mesma metodologia descrita no parágrafo 2.1. Logo após a filtração, o filtrado foi

acidificado, sob agitação, com ácido acético glacial até pH 3-4 (verificado com eléctrodo previamente calibrado).



Figura 16: Exemplo de material (filtrado e pasta) + extraído após extração alcalina com um tempo definido (2 horas).

De seguida o filtrado foi precipitado através da adição de 1000 mL de etanol puro e colocado por um período superior a 12 horas na câmara fria a 4°C onde sedimentou (Figura 17). Após separação do líquido sobrenadante o precipitado foi centrifugado, e por três vezes lavado com metanol e centrifugado. A fase sólida do material foi recolhida para um copo e adicionado metanol até submergi-la completamente. Foi depois congelada e liofilizada. Mais tarde procedeu-se à diálise (através de membranas de celofane modificado 32 mm 2000 NMWCO, Sigma D7884-5FT) em H₂O destilada, sob agitação, até condutividade constante (mínimo 2 dias com uma mudança diária de H₂O destilada). Foi posteriormente repetido o procedimento de lavagem com metanol e liofilização do material dialisado para posterior caracterização estrutural e determinação dos pesos moleculares das xilanas precipitadas.



Figura 17: Sedimentação do filtrado precipitado (xilanas).

A pasta sujeita à extração com diferentes tempos foi também seca em estufa a 60°C para posterior determinação do Teor de Pentosanas pelo método RAIZ já descrito no cap. 2.3.

No decorrer do trabalho experimental e já depois de definida a concentração de 10% de NaOH para a extração da pasta, surgiu o interesse acadêmico e industrial de caracterização estrutural das xilanas extraídas com diferentes tempos em meio alcalino com concentração de NaOH de 5% (taxa de remoção de xilanas garantidamente inferior ao máximo encontrado). Foi repetido o procedimento da extração alcalina para diferentes tempos (Tabela 9) seguindo a mesma metodologia que a extração alcalina a 10% até ao passo da precipitação etanólica com a particularidade do filtrado ter sido previamente acidificado com ácido acético glacial até pH 4-4,5. A ordem dos passos seguintes foi alterada: depois do filtrado sedimentar durante um período superior a 12 horas na câmara fria a 4°C e depois de decantado, retirado o excesso de sobrenadante e sujeito a centrifugação procedeu-se à diálise deste material através de membranas de celofane modificado 32 mm (porosidade 2000 NMWCO, Sigma D7884-5FT) em H₂O destilada até condutividade constante (mínimo 2 dias com uma mudança diária de H₂O destilada) conforme ilustrado na Figura 18 (A). Posteriormente o material dialisado foi centrifugado e lavou-se/centrifugou-se por três vezes consecutivas com metanol (Figura 18 (B)). A fase sólida do material foi recolhida para um copo e adicionado metanol até submergi-la completamente. Foi depois congelada e liofilizada para posterior maceração

de acordo com a Figura 18 (C) e acondicionamento em frascos porta-amostras com vista à caracterização estrutural e determinação dos pesos moleculares das xilanas precipitadas e isoladas.

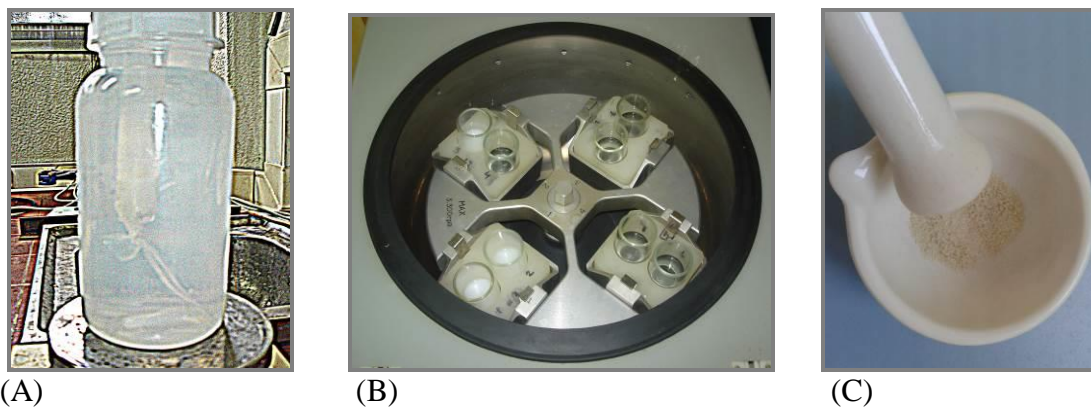


Figura 18: Últimas etapas do isolamento das xilanas (Diálise – (A); Centrifugação e lavagem – (B); Maceração – (C).

2.5. Cálculo do rendimento

O rendimento dos diferentes ensaios realizados de extração alcalina com diferentes concentrações de NaOH e diferentes tempos da extração alcalina com uma concentração de NaOH definida foi calculado através da massa de pasta (matéria-prima) utilizada para a extração e de massa extraída em cada ensaio. Foi sempre realizada a correcção do peso base seca, considerando o teor de secura determinado para cada amostra de pasta sujeita à extração alcalina.

2.6. Caracterização química e estrutural das xilanas extraídas

2.6.1. Determinação dos açúcares neutros por hidrólise com H_2SO_4

Para a determinação dos açúcares neutros, as amostras das xilanas extraídas (isoladas e purificadas) foram submetidas à hidrólise por ácido mineral (H_2SO_4) de acordo com o método previamente seleccionado no laboratório do CICECO que passa pela redução e acetilação das amostras, cuja composição em monossacarídeos foi determinada sob a forma de acetatos de alditol por cromatografia gasosa.

A $10 \pm 0,1$ mg de cada amostra de xilanas pesada num tubo *sovirel*, foram adicionados 400 μ L de H_2SO_4 a 72%. Imediatamente a seguir os tubos foram colocados numa placa de aquecimento a $30^\circ C \pm 1^\circ C$, permanecendo a incubar durante 3 horas, hidrólise forte

com o objetivo de converter os polissacarídeos em oligossacarídeos. Findo este tempo e para dar continuidade à hidrólise numa forma mais fraca, foram adicionados a cada tubo 4,4 mL de água destilada, misturando-se sempre muito bem no vortex. As amostras foram novamente sujeitas a incubação, neste passo à temperatura constante de $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2h30min; esta hidrólise mais fraca converteu os oligómeros em monómeros que no final desta etapa foram colocados na arca congeladora para posterior continuação do procedimento no dia seguinte.

A cada uma das amostras hidrolisadas adicionou-se 200 μL de 2-desoxiglucose como padrão interno (solução de 10 mg/mL). Depois foram pipetados 1 mL de cada amostra hidrolisada para novos tubos e, mantendo-os no gelo, para a sua redução foram adicionados 0,2 mL de NH_3 25% e 0,2 mL de NH_3 3 M contendo 150 mg/mL de NaBH_4 . As amostras foram colocadas na placa de aquecimento durante 1 hora a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Decorrida a incubação, as amostras foram arrefecidas em gelo e os tubos aí permaneceram para a adição consecutiva de 2 x 50 μL de ácido acético glacial, agitando no vórtex após cada utilização para garantir a decomposição do excesso de NaBH_4 . Posteriormente os tubos foram colocados na arca congeladora para dar seguimento à acetilação no dia seguinte.

Para a acetilação, a 0,3 mL de cada amostra pipetada para novos tubos mergulhados em gelo foram adicionados 0,45 mL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético. Depois de bem misturados, os tubos foram colocados na placa de aquecimento durante 30 minutos à temperatura constante de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. De seguida foram adicionados 2,5 mL de diclorometano para extrair os acetatos de alditol e depois 3 mL de água destilada para destruir o anidrido acético. Foi agitado no vórtex para acelerar a separação visual das duas fases. A fase aquosa foi retirada com uma pipeta de Pasteur e adicionou-se 2 mL de diclorometano e 3 mL de água destilada, agitando-se novamente no vórtex e retirando-se novamente a fase aquosa de igual forma. Adicionaram-se 4 mL de água destilada para lavagem das amostras que foram agitadas no vórtex e retirada a fase aquosa por mais duas vezes consecutivas, garantindo assim uma boa lavagem das amostras. O diclorometano foi evaporado sob fluxo de azoto e a amostra retomada com 1 mL de acetona que foi igualmente evaporada sob fluxo de azoto, repetindo este passo mais uma vez. Os tubos foram colocados na arca congeladora para posterior análise por Cromatografia Gasosa.

Os acetatos de alditol foram analisados no Cromatógrafo de gás Varian 3350, equipado com uma coluna capilar DB-225 J&W (30 m x 0,25 mm i.d., com 0,15 µm de espessura de filme) e detector FID, usando N₂ como gás de arraste a 33 cm/s. O resíduo seco de cada amostra existente no tubo *sovirel* foi dissolvido em 100 µL de acetona seca e injectou-se 0,5 µL no equipamento com o programa de temperaturas definido para o injector, coluna e detector a 225 ° C, 220 ° C e 250 ° C, respetivamente.

2.6.2. Determinação dos açúcares por metanólise

Foram pesados $4,5 \pm 0,1$ mg de cada uma das amostras seleccionadas de xilanas isoladas num tubo *sovirel* e foram adicionados 2 mL de HCl 2M anidro (em metanol anidro). Imediatamente a seguir os tubos foram colocados numa placa de aquecimento a $100^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, permanecendo a incubar durante 4 horas. De seguida, foram adicionados 80 µL de piridina e 1 mL de padrão interno contendo 0,1 mg/mL de sorbitol (o padrão foi preparado através da dissolução de 0,5 mg de sorbitol em 5 mL de metanol absoluto). Retiraram-se 2 mL de cada tubo para novos tubos *sovirel*, levando-se as amostras à secura através de evaporação no evaporador rotativo. As amostras foram posteriormente armazenadas na arca congeladora. Foi dada continuidade ao procedimento no dia imediatamente anterior à injeção no equipamento GC/MS (Cromatógrafo de Gás 5890 Hewlet-Packard equipado com detector MSD série II): as amostras foram dissolvidas com 70 µL de piridina e de seguida, para a sua derivatização, adicionaram-se 150 µL de hexametildisiloxano (HMDS) e 80 µL de trimetilclorosiloxano (TMS). Após 12 horas à temperatura ambiente as amostras foram injectadas no GC/MS, com injector a 250 ° C, programa de temperatura do forno descrito na Tabela 10, usando hélio como gás de arraste a 35 cm/s e deteção de massas no intervalo 33-700 amu (atomic mass units).

Tabela 10: Parâmetros de temperatura do forno (° C) do Cromatógrafo do GC/MS.

| T inicial (°C) | Tempo inicial (min.) | Rampa de temperatura 1 (°C/min) | Temperatura final 1 (°C) | “Hold time” (min.) | Rampa de temperatura 2 (°C/min) | T final 2 (°C) |
|----------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------------|----------------|
| 100 | 3.00 | 4.0 | 175 | 5.00 | 12 | 290 |

2.6.3. Determinação do peso molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC)

Para a preparação das amostras foram pesados diretamente nos *vials* cerca de 5 mg de cada amostra, adicionados 60 μ L do 8% LiCl em N,N-dimetilacetamida (DMA) e depois dos *vials* terem permanecido na estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 25 minutos, foram adicionados 40 μ L do mesmo solvente, tendo os *vials* sido colocados na estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante mais 15 minutos. Foram posteriormente adicionados a cada *vial* 600 μ L de DMA 99%. Imediatamente antes da injeção das amostras no sistema de Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) adicionou-se cerca de 0,5 mg do padrão interno glucose.

A análise por SEC foi realizada num sistema PL-GPC 110 (Polymer Laboratories Ltd., UK) equipado com uma pré-coluna Plgel 10 μ m, duas colunas Plgel 10 μ m MIXED D 300 x 7,5 mm em série e um detetor de índice de refração. As colunas, o sistema de injeção e o detetor foram mantidos a 70°C . O eluente utilizado foi o 0.1M LiCl em N,N-dimetilacetamida (DMA) com um fluxo de 0,9 mL/min. A calibração das colunas foi realizada utilizando padrões de *pululans* (maltotrioses da Polymer Laboratories, UK) com um intervalo de pesos moleculares de 5,1-48,0 kDa.

2.6.4. Análise estrutural por espectroscopia de RMN

2.6.4.1. RMN de ^1H

Foram pesadas diretamente nos *vials* $5 \pm 0,1$ mg de cada amostra e adicionou-se 7 μ L de água deuterada (D_2O). Os *vials* foram rolhados ficando a solução sob agitação durante 2 dias para garantir a total dissolução do precipitado. Depois foi adicionado a cada uma cerca de 0,1 mg de padrão 2,2,3,3- d_4 -trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado (TMSP). As amostras assim preparadas foram colocadas, com o auxílio duma pipeta de Pasteur, em tubos para RMN. As xilanas dissolvidas em D_2O foram analisadas por ^1H RMN a 303 K num espectrómetro de RMN FT Bruker AVANCE 300 a operar a 300,13 MHz. Os parâmetros de aquisição foram: 12,2 μ s com comprimento de pulso 90° com 15 s de atraso e 300 scans.

2.6.4.2. RMN de ^{13}C

Depois da leitura e interpretação dos espectros de RMN ^1H foi selecionada a amostra de xilanas extraídas com NaOH 10%, durante 15 minutos para a obtenção do espectro RMN de ^{13}C . A amostra anteriormente preparada em D_2O foi analisada a 303 K usando um espectrômetro de RMN FT Bruker ASCEND 500 a operar a 125,78 MHz. Os parâmetros de aquisição foram: comprimento de pulso 90° com 1,5 s de atraso e 8000 scans.

2.6.4.3. RMN 2D ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC

A amostra selecionada para a obtenção do espectro de ^{13}C foi também a usada para a obtenção dos espectros 2D ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C .

O espectro bidimensional 1H-1H TOCSY foi adquirido num espectrômetro Bruker AMX 300, a 60° , com uma largura espectral de 2185 Hz. O tempo de relaxação foi de 2.0s. Para cada FID foram adquiridos 128 scans com 1024 e 512 pontos para t1 e t2, respetivamente.

O espectro HSQC com detecção em 1H foi adquirido num espectrômetro de RMN FT Bruker ASCEND 500 com 128 scans por incremento e uma largura espectral de 12000 Hz e 2000 Hz em F1 e F2, respetivamente e com 2048 e 1024 pontos em F1 e F2, respetivamente. O tempo entre cada scan foi de 2 s e o tempo de transferência de polarização foi otimizado para $^1\text{J}_{\text{C-H}}=150$ Hz.

3. Análise e discussão dos resultados

3.1. Avaliação do perfil da extração das xilanas de pasta branca kraft do *E. globulus*

A extração com solventes orgânicos preserva, tanto quanto possível, a estrutura original da xilana. No entanto, optou-se pela extração alcalina de pasta branca kraft porque a maior parte dos substituintes acetílicos nativos da sua estrutura apresentam-se já clivados após o cozimento e o branqueamento, afetando positivamente a sua solubilidade em meio alcalino e porque o rendimento da extração alcalina é superior à extração com solventes orgânicos (13, 29).

3.1.1. Parâmetros da extração alcalina avaliados: concentração de NaOH e tempo de reação de extração

Para a quantificação do teor de xilanas extraídas de pasta branca kraft com soluções aquosas de NaOH, foi determinado o teor de pentosanas na pasta antes e após a extração. Depois de calculada e considerada a perda mássica da pasta e tendo como referência o teor de pentosanas da matéria-prima, foi quantificado por diferença, o teor de pentosanas removidas.

A análise da Figura 19 permite concluir que há uma evolução positiva da taxa de remoção das xilanas extraídas da pasta branca kraft do *E. globulus* com o aumento da concentração de NaOH de 4% até 12%. Os teores de remoção de pentosanas mais elevados, 91,5% e 93,2%, correspondem à extração com soluções de NaOH 10% e 12%, respetivamente. A partir da concentração de 12% há uma diminuição do teor de xilanas removidas da pasta justificado pelo efeito Gibbs-Donann, onde o entumescimento da fibra celulósica encontra o seu máximo com aquela concentração de NaOH. Atendendo a eventuais gastos do reagente à escala industrial com resultado semelhante de remoção de xilanas, a extração alcalina com 10% de NaOH será mais rentável do que com 12%. Sendo assim, o perfil de extração com solução de NaOH 10% foi estudado com maior detalhe.

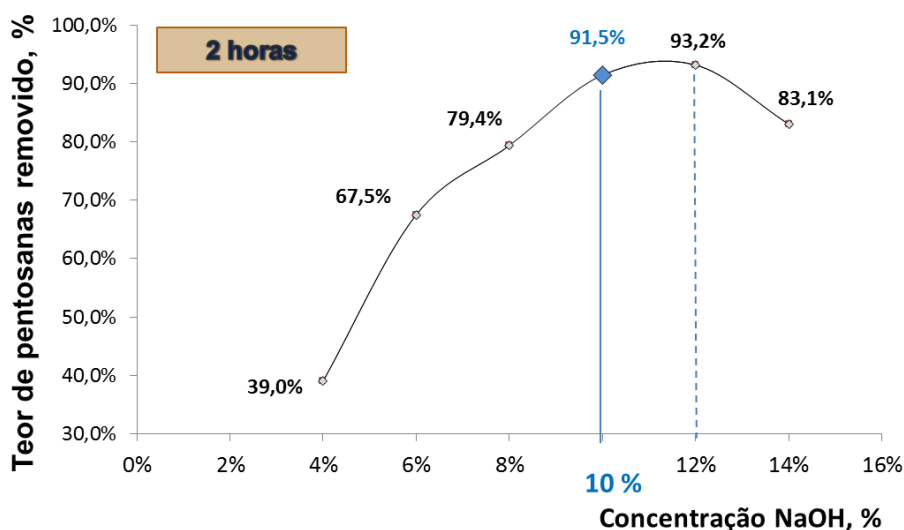


Figura 19: Teor de remoção de pentosanas da pasta branca kraft do *E. globulus* na extração alcalina durante 2 horas com diferentes concentrações de NaOH (% relativa ao Teor de Pentosanas da matéria-prima).

A avaliação do tempo da reação de extração alcalina com NaOH 10% é mostrada na Figura 20. Nota-se um aumento do teor de remoção de pentosanas desde os 15 minutos de reação até tempos compreendidos entre 1 e 2 horas, onde, para além de se verificar, uma velocidade de extração constante com tendência a decrescer, são apresentadas taxas de remoção das xilanas de 88,8% e 91,2%, respetivamente. A partir das 2h de reação há um decréscimo progressivo na percentagem de remoção de pentosanas até às 4 horas, tempo máximo avaliado no âmbito do trabalho. Esta inversão da tendência na velocidade de extração estará relacionada com a degradação progressiva das xilanas extraídas. Como durante a primeira hora atinge-se o teor de xilanas removidas quase máximo, não se justifica o prolongamento de extração para tempos superiores.

De acordo com os resultados obtidos na avaliação do perfil (alcalinidade e tempo), e com vista a dar resposta em tempo útil a outros trabalhos de investigação a decorrer em simultâneo, foi considerado que o perfil de extração com solução de NaOH 10% durante 1 hora é aquele que responde a uma melhor relação taxa de solubilidade máxima/rendimento de xilanas.

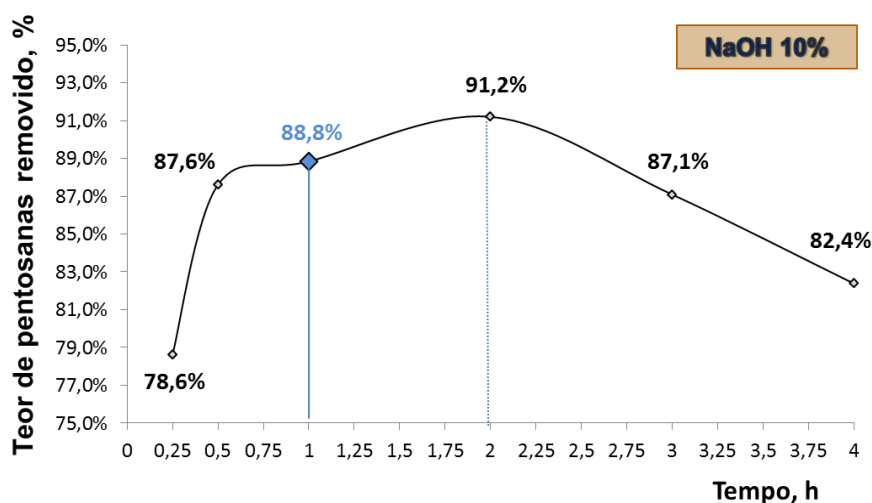


Figura 20: Variação ao longo do tempo do teor de remoção de pentosanas da pasta branca kraft do *E. globulus* na extração alcalina com NaOH 10% (% relativa ao Teor de Pentosanas da matéria-prima).

Dependendo do produto de valor acrescentado a produzir nas indústrias papelreira convencional e não papelreira, o teor de xilanas residuais na pasta pode ser variável. Nesta perspectiva, o isolamento total de xilana pode não ser necessário e foi, por isso, também analisada a variação ao longo do tempo do teor de pentosanas removido da pasta branca kraft do *E. globulus* na extração alcalina com NaOH 5% (Figura 21).

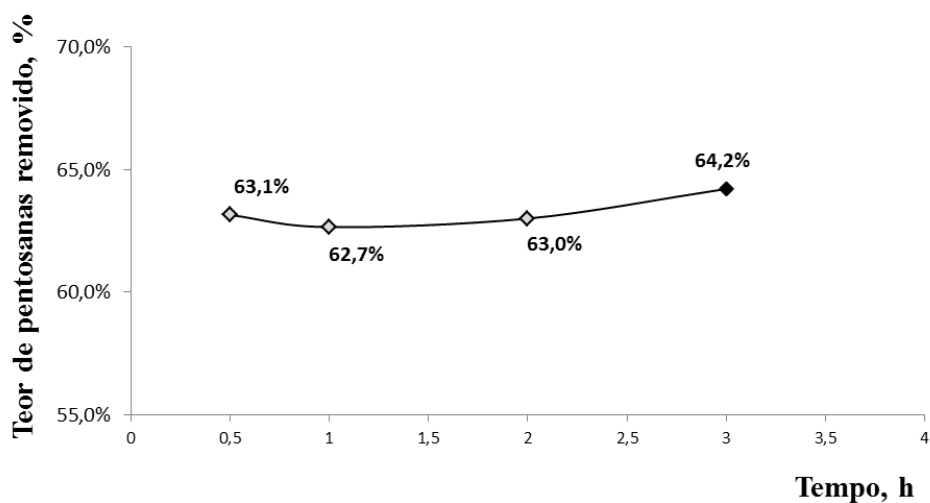


Figura 21: Variação ao longo do tempo do teor de remoção de pentosanas da pasta branca kraft do *E. globulus* na extração alcalina com NaOH 5% (% relativa ao Teor de Pentosanas da matéria-prima).

Na avaliação do tempo da reação de extração alcalina com NaOH 5%, mostrada na Figura 21, nota-se que não existe uma grande variação no teor de xilanas removidas no intervalo de tempo estudado, desde os 30 minutos até às 3 horas de extração, sendo 62,7% o valor mínimo e 64,2% o valor máximo, correspondendo a 3h de extração. Estes valores são da mesma ordem de grandeza e que mostram que, para esta concentração de solução de NaOH, a velocidade de extração é igual à velocidade de degradação das xilanas. O tempo mínimo estudado (30 minutos) será, por isso, mais rentável, não se justificando tempos elevados de extração.

O leque de aplicações das xilanas processadas depende, tal como já discutido, da sua taxa de solubilidade. A Figura 22 compara o teor de xilanas removido com solução de NaOH 10% e 5%, com ordens de grandeza de 90% e 60%, respetivamente, demonstrando que, neste trabalho, a extração alcalina com solução de NaOH 5% extrai cerca de 70% do máximo encontrado com a solução de NaOH 10%, mais concretamente 72%, 70,6%, 69,1% e 73,7% para os tempos de extração de 30 minutos, 1, 2 e 3 horas, respetivamente. Depois de analisar também as Figura 20 e Figura 21, estes valores sugerem que, para ambas as soluções com diferentes concentrações, a velocidade de extração atinge o seu máximo entre as 1 e 2 horas e que a velocidade de degradação atinge o seu mínimo nesse intervalo.

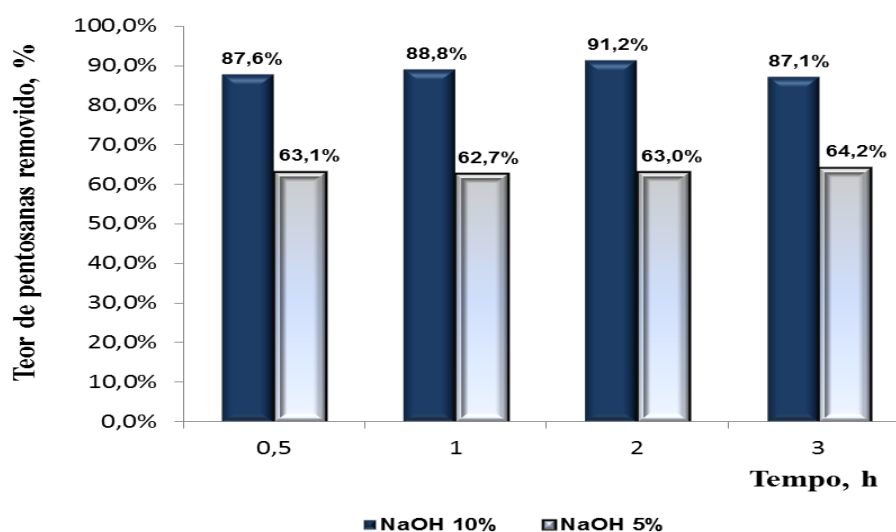


Figura 22: Comparação da variação ao longo do tempo do teor de redução de pentosanas da pasta branca kraft do *E. globulus* na extração alcalina com NaOH 10% e 5% (% relativa ao Teor de Pentosanas da matéria-prima).

3.2. Caracterização química e estrutural da xilana extraída (isolada e purificada)

Para além da definição do perfil de extração alcalina, este trabalho teve como objetivo a caracterização química e estrutural das xilanas constituintes da pasta branca kraft do *E. globulus* após a extração alcalina, e, em comparação com a estrutura das xilanas da madeira do *E. globulus*, avaliar que diferenças na estrutura podem ser afectas à alcalinidade e ao tempo da reacção de extração.

3.2.1. Determinação dos açúcares neutros

O método mais utilizado para a análise dos monossacarídeos neutros constituintes da pasta celulósica inclui a hidrólise por ácidos minerais concentrados (29), principalmente com H_2SO_4 que favorece a hidrólise dos monómeros das hemiceluloses. Com este método são determinados os açúcares neutros e consequente avaliação do grau de pureza das xilanas extraídas; sabendo-se que quanto maior o teor de xilose, maior o grau de pureza das xilanas (35, 36, 38).

Após a hidrólise ácida, os acetatos de alditol obtidos a partir dos monossacarídeos, foram analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID), cujos resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Composição em monossacarídeos neutros das xilanas extraídas da pasta branca kraft do *E. globulus*.

| Parâmetros da extração alcalina | | Monossacarídeos neutros (%) | | | | | |
|---------------------------------|-------|-----------------------------|------------|-----|-----|-----|-----------|
| [NaOH] (%) | T (h) | Glc | Xyl | Rha | Ara | Man | Gal |
| 10% | 0,25 | 3,3 ± 0,2 | 96,7 ± 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 0,5 | 6,5 ± 0,1 | 93,5 ± 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1 | 2,3 ± 2,3 | 97,7 ± 2,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 2 | 4,0 ± 0,5 | 96,0 ± 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 3 | 4,8 ± 0,2 | 95,1 ± 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5% | 0,5 | 0,1 ± 0,1 | 99,6 ± 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 ± 0,2 |
| | 1 | 0,2 ± 0,2 | 99,3 ± 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 ± 0,2 |
| | 2 | 0,2 ± 0,1 | 96,6 ± 2,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,2 ± 2,4 |
| | 3 | 0,5 ± 0,2 | 98,6 ± 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 ± 0,2 |

Apesar de não apresentado nesta discussão dos resultados, o teor de cinzas foi determinado e o valor encontrado para as amostras de xilanas extraídas (isoladas e dialisadas) foi inferior a 1%. Nas xilanas extraídas com NaOH de concentração de 10% destaca-se o grau de pureza mais elevado para o tempo de 1 hora de extração (teor de xilose de 97,7%). Todas as amostras de xilanas isoladas da pasta branca kraft do *E. globulus* apresentam um grau de pureza elevado, com quantidades de xilose, em massa, acima dos 93%. As xilanas extraídas com NaOH de concentração de 5% apresentaram, duma maneira geral, um grau de pureza mais elevado do que as extraídas com concentração de 10% e apresentaram ainda quantidades vestigiais de glucose e galactose. Com o aumento da alcalinidade de 5% para 10% de NaOH observou-se, para todos os tempos equivalentes, uma diminuição do teor de galactose e um ligeiro acréscimo do teor de glucose. Apesar da literatura (31) sugerir que os teores de Glcp, na análise dos açúcares, se dever a pequenos fragmentos de polissacarídeos de diferentes origens mais provavelmente ligados à cadeia principal da xilana, como estamos perante xilanas parcialmente ramificadas era esperado que o teor de glucose também diminuísse, contudo, as razões para o acréscimo do teor da glucose com o aumento da alcalinidade do meio, são provavelmente a co-precipitação com as xilanas de pequena quantidade de β - e γ -celulose e a maior degradação das unidades MeGlcA laterais.

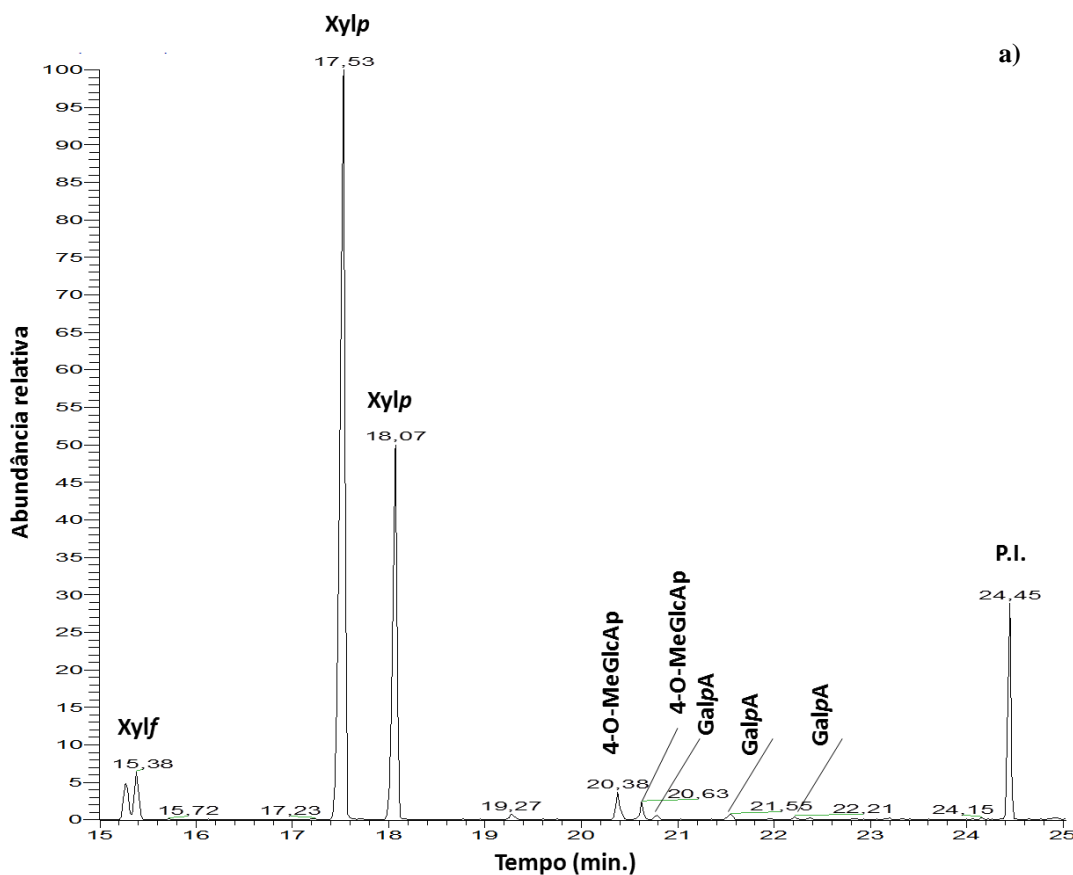
Importa acrescentar que esta tendência, nos teores de galactose, sugere que as xilanas extraídas em meio menos alcalino (NaOH 5% em relação a NaOH 10%) apresentam um maior grau de ramificação. O menor índice de degradação das cadeias laterais encontrado, das unidades de ácido 4-*O*-Me- α -D-glucurónico ramificado na posição *O*-2 com unidade de D-galactose (MeGlcA-2Gal), será o responsável pelos valores de galactose mais alto nas xilanas extraídas com solução de NaOH 5%. Assim, aplicando a solução de NaOH 5%, pode ser extraída uma xilana com menor alteração estrutural devido a menos acentuadas reações de degradação alcalina.

3.2.2. Hidrólise por metanólise ácida

A reação de metanólise ácida é um método bastante seletivo usado na análise dos polissacarídeos acessíveis da pasta, essencialmente as hemiceluloses. Com este método consegue determinar-se o teor das hemiceluloses na pasta e composição química de

hemiceluloses (35). O método da metanólise ácida distingue-se do da hidrólise ácida devido à possibilidade de também determinar unidades de ácidos urónicos. Nas reações de metanólise há a hidrólise da ligação glicosídica com metilação do C₁ de cada açúcar preservando os polissacarídeos dos açúcares contra a degradação e formação de isómeros.

Para a hidrólise por metanólise ácida foram selecionadas as amostras resultantes da extração alcalina com NaOH 10% durante 15 minutos e NaOH 5% durante 30 minutos. Na Figura 23 a) e b) estão apresentados os cromatogramas dos açúcares metilados obtidos das amostras de xilanas isoladas e selecionadas da pasta branca kraft do *E. globulus*. Os resultados obtidos por GC/MS mostram a presença de várias unidades estruturais dos açúcares metilados, compostos identificados por comparação com a base de dados já desenvolvida pelo grupo de investigação nesta área da Universidade de Aveiro.



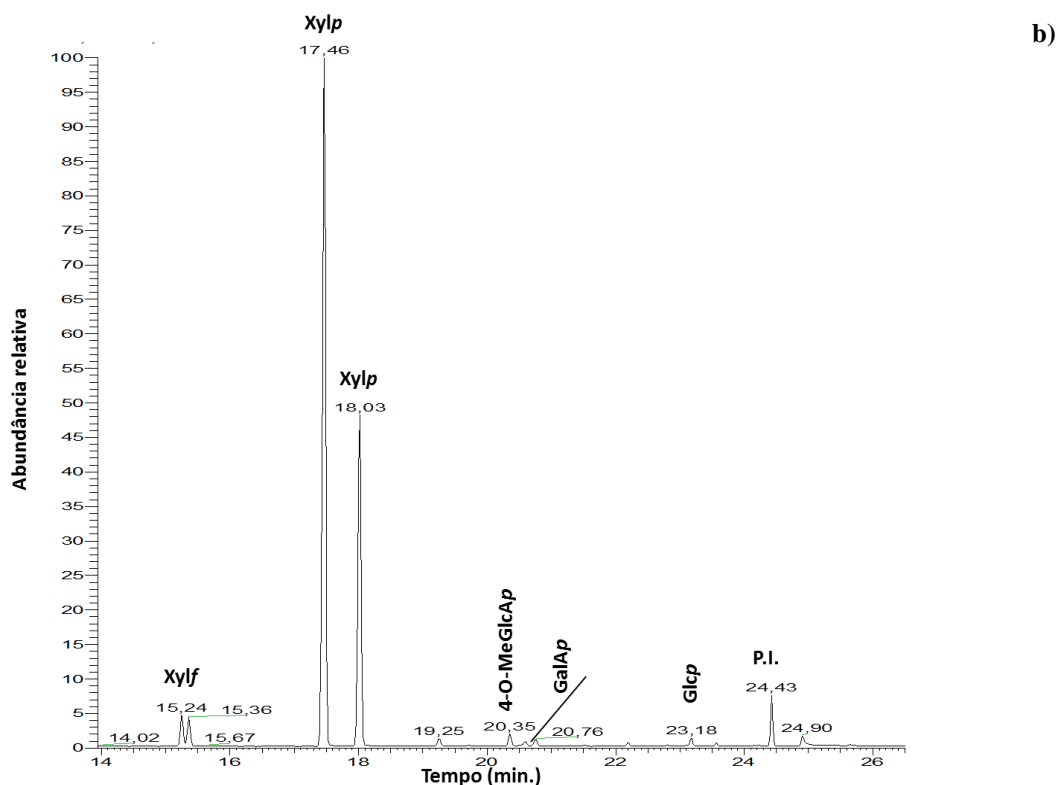


Figura 23: Cromatogramas dos açúcares metilados obtidos por metanólise ácida das xilanas isoladas e purificadas das amostras selecionadas;
 a) extração alcalina com NaOH 5%; 30 min. –
 b) extração alcalina com NaOH 10%; 15 min.
 P.I. Padrão Interno.

Com a metanólise ácida foi confirmado o elevado grau de pureza das duas amostras de xilanas selecionadas através da predominância da xilose em ambas (Tabela 11 e Tabela 12:).

Tabela 12: Percentagem dos açúcares metilados obtidos por metanólise ácida das amostras selecionadas de xilanas extraídas (isoladas e purificadas)

| Parâmetros da extração alcalina | | Unidades estruturais dos açúcares metilados (%) | | | | |
|---------------------------------|-------|---|------------|------|-----|-------|
| [NaOH] (%) | t (h) | Xyl | 4-O-MeGlcA | GalA | Gal | Glc |
| 10% | 0,25 | 95,2 | 2,0 | 0,8 | 0,1 | 1,6 |
| 5% | 0,5 | 94,6 | 4,1 | 0,4 | 0,6 | < 0,1 |

São verificados, com a hidrólise ácida (Tabela 11), maiores teores de xilose, galactose e glucose para qualquer uma das duas amostras de xilanas, quando comparados com os determinados com a metanólise ácida (Tabela 12:). Duas razões justificam estes dados:

1^a - a hidrólise ácida pode ter sido incompleta, não ter hidrolisado completamente todas as hemiceluloses até aos açúcares monómeros e por isso não serem totalmente detectados utilizando GC/FID; 2^a - a ponderação de cada unidade estrutural do açúcar metilado baixa com a metanólise ácida, devido à possibilidade de, com esta técnica, ser possível determinar também unidades de ácidos urónicos.

A presença de uma pequena percentagem de glucose e vestígios de glucose nas amostras de xilanas extraídas com NaOH 10%, 15 minutos e NaOH 5%, 30 minutos, respetivamente confirma os resultados obtidos para a composição química dos monossacarídeos neutros Glc apresentados na Tabela 11. A tendência verificada nos teores de galactose é também confirmada com a metanólise ácida quando comparada com os resultados do GC/FID: vestigiais para a amostra de xilanas extraídas com NaOH 10% - 15 minutos e um pouco superior para a amostra de xilanas extraídas com NaOH 5% - 30 minutos. Tendo em conta a estrutura peculiar das xilanas da madeira do *E. globulus* que possuem ramificação em *O*-2 com ácido 4-*O*-metilglucurónico substituído em *O*-2 com galactose, e considerando também que a percentagem das unidades estruturais dos açúcares metilados do 4-*O*-MeGlcA na amostra de xilanas extraídas com solução de NaOH 5% é o dobro da percentagem das mesmas unidades estruturais na amostra de xilanas extraídas com solução de NaOH 10%, estes resultados sugerem que a extração alcalina com NaOH 5% - 30 minutos, quando comparada à extração com NaOH 10% - 15 minutos, levou ao isolamento de uma fracção da xilana com maior proporção desta ramificação.

3.2.3. Análise estrutural por espectroscopia de RMN

A análise estrutural das amostras de xilanas por espectroscopia de RMN permitiu obter informação das estruturas relevantes identificadas (unidades internas da cadeia principal da xilana, MeGlc α A, MeGlc α A-2Gal β) e, a par da literatura (6, 14, 15), concluir quanto às respectivas atribuições na cadeia polimérica principal da xilana isolada da pasta kraft branca do *E. globulus*. A interpretação dos espectros e confirmação da estrutura foi conseguida por comparação das Bases de Dados já existentes e com a conjugação das técnicas de RMN mono e bidimensional.

3.2.3.1. RMN de ^1H

Para a caracterização estrutural através de RMN de ^1H foram selecionadas as amostras de xilanas isoladas com concentrações de NaOH 5% e 10% com tempos de 0,5h, 1h, 2h, 3h e 0,25h, 0,5h, 1h, 2h, 3h, respectivamente. Na Figura 24, Figura 25 e Figura 26 são apresentados três dos nove espectros de RMN de ^1H obtidos.

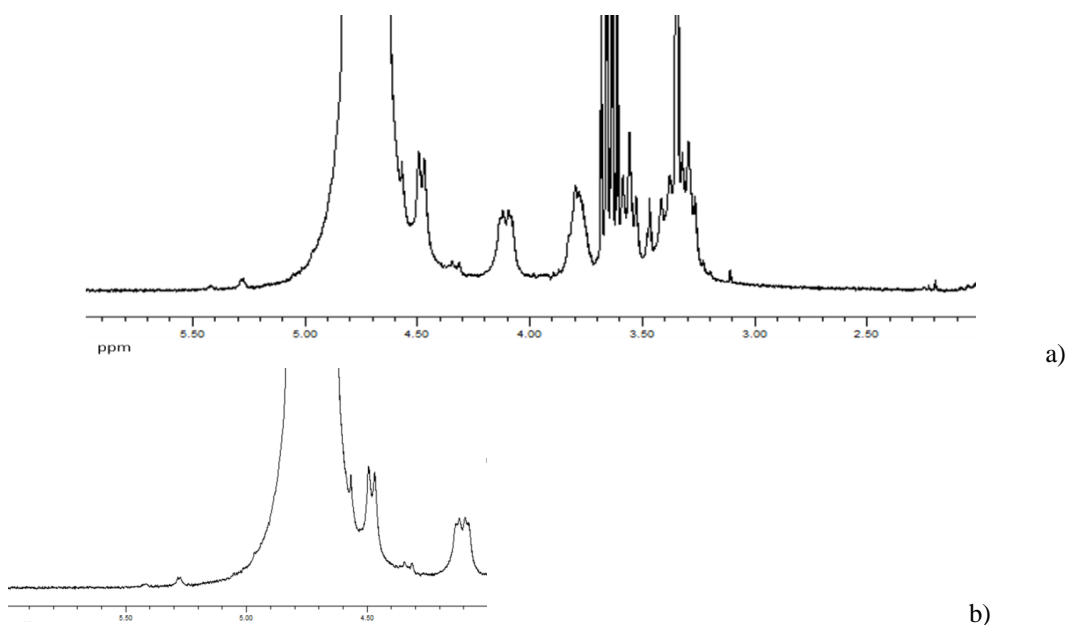


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do *E. globulus* (a) e a região expandida dos prótons anoméricos (b).

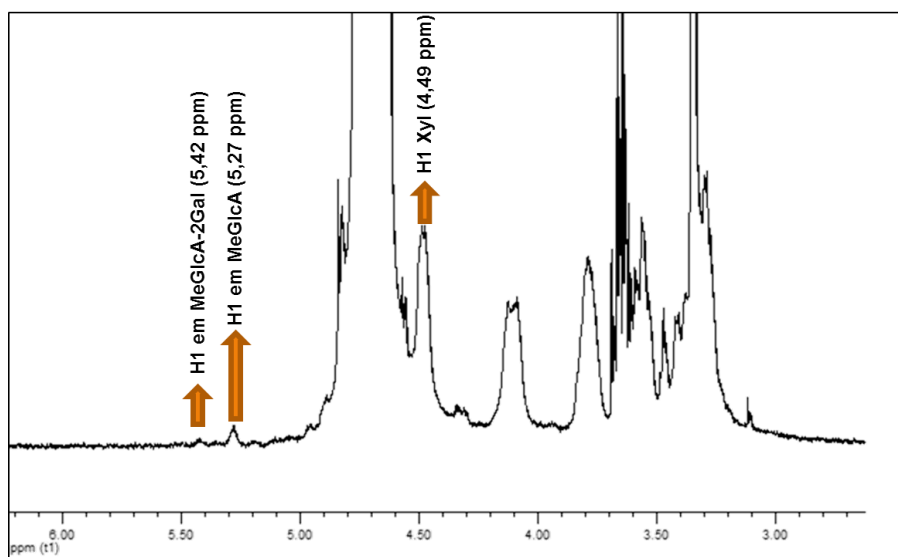


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 1 hora) da pasta branca kraft do *E. globulus* com os prótons anoméricos identificados.

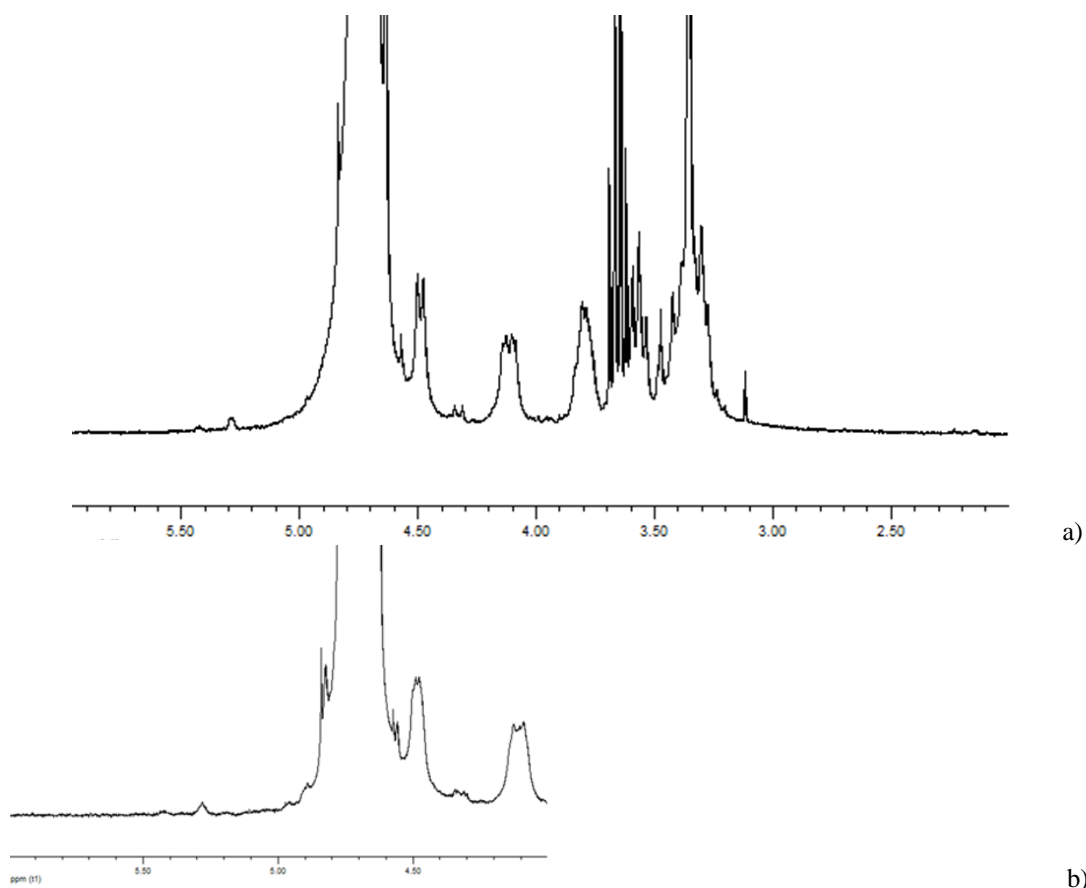


Figura 26: Espectro de RMN de ¹H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 5%, 2 horas) da pasta branca kraft do *E. globulus* (a) e região expandida dos prótons anoméricos (b).

Todos os espectros de RMN de ¹H obtidos apresentaram um grande sinal H₂O o que não permitiu visualizar bem eventuais desvios químicos de outras unidades estruturais, por exemplo unidades de xilopiranos acetiladas, contudo para a discussão deste ponto foi selecionada a Figura 25 com o espectro de RMN de ¹H obtido para a amostra de xilana extraída em meio alcalino com NaOH 10%, 1 hora. Nesta Figura é possível observar desvios químicos (δ) a 5.42 ppm e a 5.28 ppm, sinais correspondentes às ressonâncias dos prótons H1 da MeGlcA-2Gal e MeGlcA (15), respectivamente. A menores desvios químicos é possível distinguir a 4.49 ppm o correspondente às ressonâncias dos prótons H1 da cadeia polimérica principal da xilana (15). Desta forma confirmam-se os desvios químicos para a região expandida dos prótons anoméricos, sendo dominada por sinais de prótons constituintes da cadeia polimérica principal da xilana, para além das estruturas MeGlcA e MeGlcA-2Gal.

Não são observados, por exemplo, δ dos prótons da Xyl-Ac a 4,42 ppm, 4,58 ppm, 3,22 ppm, 3,54 ppm, 3,76 ppm, 3,38 ppm e 4,05 ppm (15). Devido à extração alcalina, tal

como espectável, as unidades de xilopiranosose acetiladas sofreram clivagem não sendo visíveis nos espectros de RMN de ^1H os sinais referentes aos prótons em Ac daquelas unidades.

A análise de todos os espectros de RMN ^1H , aqui representados com a Figura 24, Figura 25 e Figura 26 permitiu concluir acerca da concordância dos desvios químicos independentemente dos parâmetros da extração alcalina.

3.2.3.2. RMN de ^{13}C

Depois de concluída a concordância dos desvios químicos das várias amostras de xilanas isoladas por análise de RMN de ^1H , as estruturas predominantes (cadeia polimérica principal da xilana, MeGlcA e MeGlcA-2Gal) foram confirmadas através da caracterização estrutural de RMN de ^{13}C para a qual foi selecionada a amostra de xilanas resultantes da extração alcalina de NaOH 10%, 15 min e cujo espectro é apresentado na Figura 27.

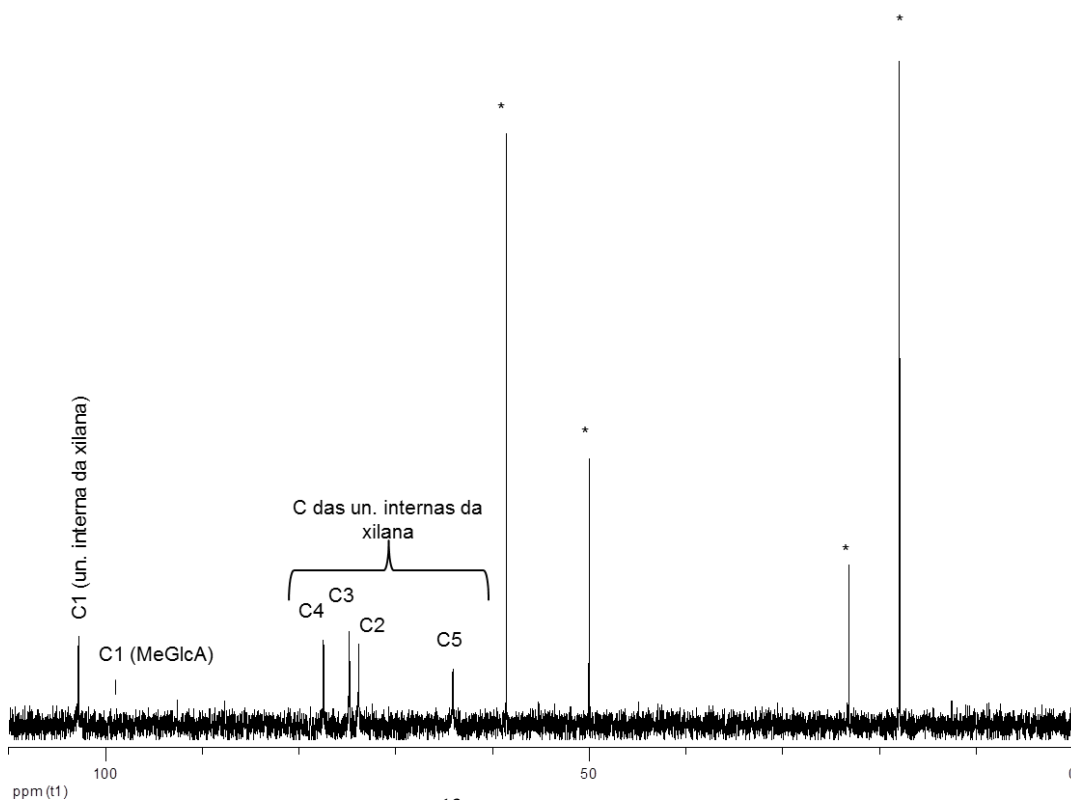


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do *E. globulus* (impurezas representadas por *).

As diferentes ressonâncias encontradas correspondem a carbonos das unidades internas da cadeia principal da xilana confirmadas a partir da literatura (14, 15) onde é possível observar desvios químicos a 102.8 ppm (C1), 73.8 ppm (C2), 74.5 ppm (C3), 77.4 ppm (C4), 64.0 ppm (C5) e a carbonos C1 do Ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico (MeGlcA) com δ a 98.8 ppm. Com esta análise não foi possível confirmar os desvios químicos dos carbonos do MeGlcA-2Gal devido à pequena abundância dos mesmos.

Os desvios assinalados são concordantes com os identificados nos espectros de RMN de ^{13}C referentes aos carbonos constituintes das ligações internas dos fragmentos (1 \rightarrow 4)- β -D-xilosilo da 2-*O*- α -D-galactopiranosilo-4-*O*-metil- α -D-glucuronoxilana da madeira do *E. globulus* revistos na literatura (14, 15) onde são identificados os sinais 101.7, 75.4, 73.9, 72.5 e 63.2 ppm correspondentes aos C1, C4, C3, C2 e C5 respetivamente (14, 15).

3.2.3.3. RMN 2D ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC

Para a confirmação das estruturas predominantes (cadeia polimérica principal da xilana, MeGlcA e MeGlcA-2Gal) através da caracterização estrutural de RMN 2D ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C TOCSY e HSQC foi também selecionada a amostra de xilanas resultantes da extração alcalina de NaOH 10%, 15 min, tal como para a caracterização estrutural de RMN de ^{13}C . Os espectros de RMN 2D ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C TOCSY e HSQC estão ilustrados na Figura 28 e Figura 29, respetivamente.

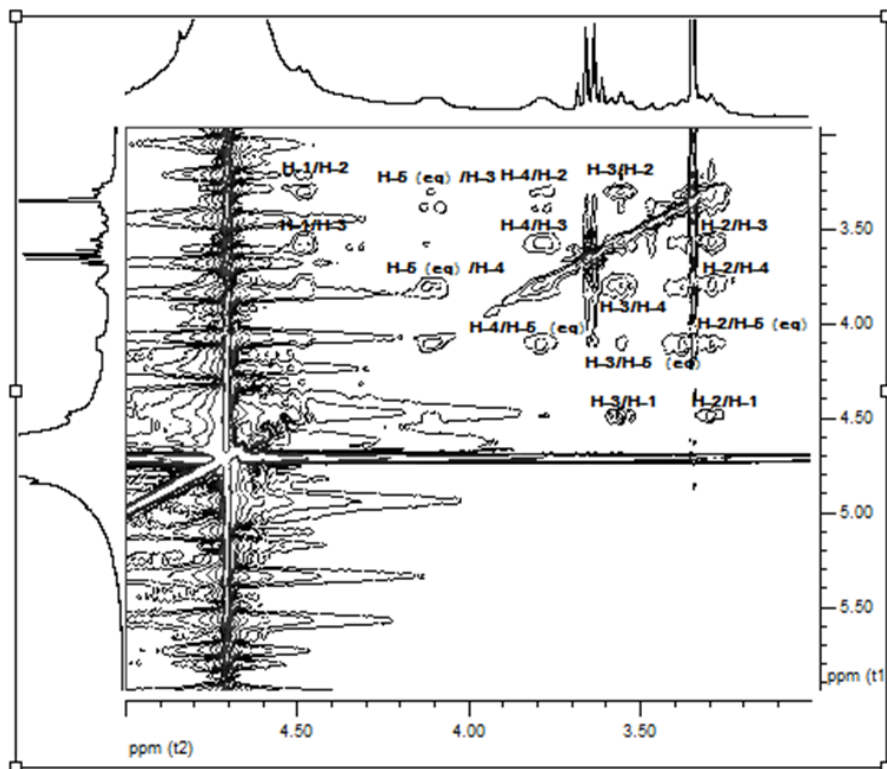


Figura 28: Espectro de RMN 2D TOCSY ^1H - ^1H da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do *E. globulus*.

Da análise por TOCSY foi possível correlacionar os prótons referentes à cadeia polimérica principal da xilana com δ identificados na Tabela 13; referenciando-se aqui alguns: H-1/H-2 (4.49/3.32 ppm), H-1/H-3 (4.49/3.50 ppm), H-2/H-1 (3.32/4.49 ppm), H-2/H-3 (3.32/3.50 ppm), H-2/H-4 (3.32/3.77 ppm), H-2/H-5_{eq} (3.32/4.11 ppm), H-3/H-1 (3.50/4.48 ppm). Apesar de graficamente não estarem assinalados na Figura 28, devido a efeitos de “ruído”, foram também detectadas as correlações dos H-1/H-3 (5.27/3.85 ppm) da unidade estrutural MeGlcA e também dos H-2/H-3 (3.78/3.85 ppm) da unidade estrutural MeGlcA-2Gal (14, 15).

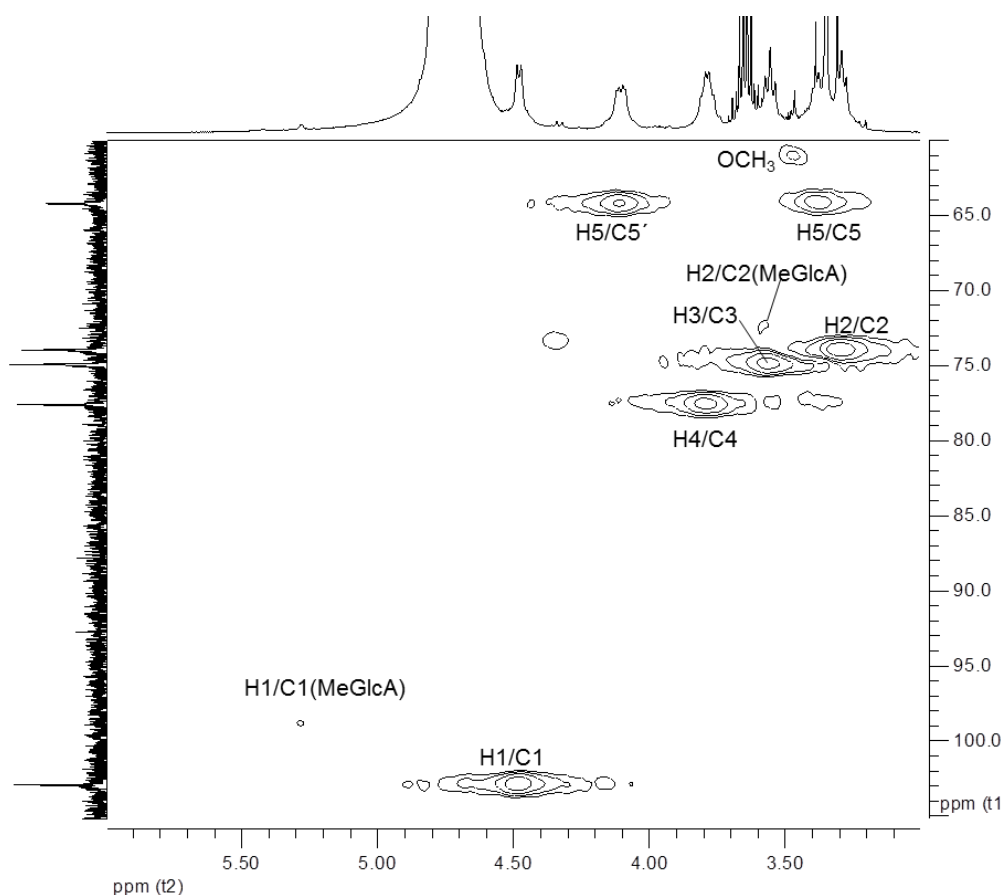


Figura 29: Espectro de RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C da xilana extraída em meio alcalino (NaOH 10%, 15 minutos) da pasta branca kraft do *E. globulus*.

O espectro de HSQC permitiu identificar as ressonâncias dos carbonos constituintes da cadeia polimérica principal da xilana, sendo possível identificar a correlação de vários sinais: 63.90 ppm correlaciona-se com 4.07 ppm permitindo-o identificar como pertencendo à ressonância do C5_{eq} ; 102.8/4.49 ppm ao C1; 78.08/3.77 ppm ao C4; 74.53/3.50 ppm ao C3; 72.51/3.32 ppm ao C2; 64.07/3.38 ppm ao C5_{ax} (14, 15).

Com o espectro na Figura 29 foi ainda possível correlacionar os desvios químicos 98.8/5.27 ppm e 72.4/3.58 ppm correspondentes às ressonâncias dos C1 e C2, respetivamente da unidade MeGlcA (14, 15).

Apesar de graficamente não assinalado na Figura 29, devido a baixa intensidade de sinal, foi também detectada a correlação dos desvios químicos 98.2/5.42 ppm correspondente à ressonância do C1 da unidade estrutural MeGlcA-2Gal (14, 15).

Deste modo, conclui-se que os desvios químicos mais relevantes da amostra selecionada de xilanas isoladas são concordantes com os atribuídos aos carbonos constituintes das ligações internas dos fragmentos (1—4)- β -D-xilosil e já atribuídos na literatura (14, 15, 32).

Tabela 13: Desvios químicos das unidades estruturais relevantes identificadas na amostra de xilana isolada com extração alcalina com NaOH 10% durante 15 min.

| Unidades estruturais relevantes | Desvios químicos (δ , ppm) | | | | | |
|---------------------------------|------------------------------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
| | H-1/C-1 | H-2/C-2 | H-3/C-3 | H-4/C-4 | H-5/C-5 (ax) | H-5/C-5 (eq) |
| Xylp | 4.49/102.8 | 3.32/72.51 | 3.50/74.53 | 3.77/78.08 | 3.38/64.07 | 4.11/63.90 |
| MeGlcA | 5.27/98.8 | 3.58/72.4 | 3.81/n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| MeGlcA-2Galp | 5.42/98.2 | 3.78/n.d. | 3.85/n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

n.d., não determinado

3.2.4. Conclusões acerca da estrutura empírica da xilana extraída da pasta branca kraft do *E. globulus*

A análise da Tabela 13 e da Tabela 14 e por comparação com a literatura (6, 14, 15) que estudou a estrutura da cadeia principal da xilana da madeira nativa do *E. globulus*, mostrou a presença, nas xilanas extraídas, das principais unidades estruturais características das xilanas daquela espécie. Esta conclusão é baseada nos resultados obtidos após a integração dos principais desvios químicos que revelam o domínio dos sinais de prótons H1 constituintes da cadeia polimérica principal da xilana, para além dos sinais relativos às ressonâncias dos prótons H1 das unidades estruturais, como as MeGlcA-2Gal e MeGlcA (Tabela 13). Desta forma e após integração destes sinais correspondentes à região expandida dos prótons anoméricos, foi possível determinar a abundância relativa das unidades estruturais da cadeia polimérica principal da xilana, MeGlcA-2Gal e MeGlcA.

A abundância relativa das unidades estruturais relevantes de ácidos urónicos determinada com a técnica de RMN, quando comparada com a determinada com a metanólise ácida (Tabela 12:), apresenta resultados mais altos, sugerindo uma maior acessibilidade das unidades ramificadas solúveis em D₂O quando é feita a leitura da estrutura com a técnica de RMN, para além de ser possível um erro experimental da

metanólise, não se conseguindo garantir que foram todas hidrolisadas e metiladas. Estes resultados foram de acordo com o descrito na literatura (35) onde é mencionado que, com o método de metanólise, são normalmente determinados teores dos grupos urónicos inferiores aos obtidos por ^1H RMN.

Tabela 14: Abundância relativa das unidades estruturais relevantes identificadas.

| Parâmetros da extração alcalina | | Abundância relativa das unidades estruturais relevantes (<i>per</i> 100 unidades Xylp) | | |
|---------------------------------|-----------|---|--------|-----|
| [NaOH] (%) | Tempo (h) | MeGlcA-2Gal | MeGlcA | Xyl |
| 10 | 0,25 | 3 | 5 | 92 |
| | 0,5 | 3 | 5 | 92 |
| | 1 | 3 | 5 | 92 |
| | 2 | 3 | 5 | 92 |
| | 3 | 3 | 5 | 92 |
| 5 | 0,5 | 3 | 5 | 92 |
| | 1 | 3 | 5 | 92 |
| | 2 | 3 | 5 | 92 |
| | 3 | 3 | 5 | 92 |

3.2.5. Determinação do peso molecular por Cromatografia Exclusão Molecular (SEC)

A Cromatografia de Exclusão molecular (SEC) é uma técnica de separação cromatográfica que permite separar a amostra em várias fracções de acordo com o seu peso molecular.

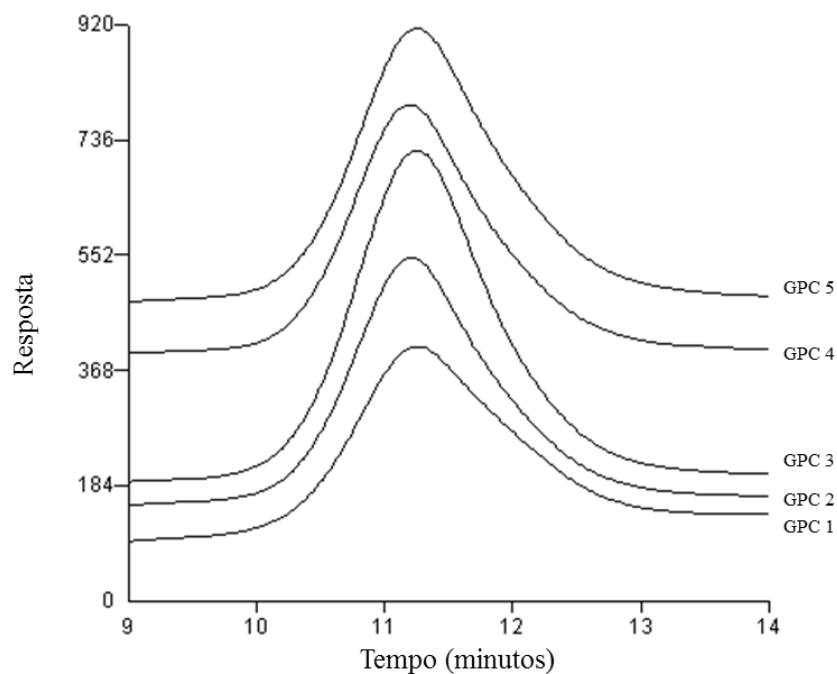
A distribuição dos pesos moleculares das amostras de xilanas extraídas é apresentada na Tabela 15. O seu perfil de eluição em SEC é apresentado na Figura 30 e Figura 31.

Tabela 15: Resultados obtidos do SEC.

| Parâmetros da extração alcalina | | Amostra | M _w (Da) | M _n (Da) | PD |
|---------------------------------|-------|---------|---------------------|---------------------|------|
| [NaOH] (%) | T (h) | | | | |
| 10% | 0,25 | GPC1 | 22600 | 14800 | 1,52 |
| | 0,5 | GPC2 | 22900 | 16300 | 1,41 |
| | 1 | GPC3 | 22900 | 15700 | 1,46 |
| | 2 | GPC4 | 23100 | 16400 | 1,40 |
| | 3 | GPC5 | 22700 | 15800 | 1,44 |
| 5% | 0,5 | GPC6 | 20100 | 14200 | 1,42 |
| | 1* | GPC7* | 15000* | 8900 | 1,70 |
| | 2 | GPC8 | 21800 | 15400 | 1,41 |
| | 3 | GPC9 | 21400 | 14900 | 1,44 |

M_w: Peso molecular ponderado; M_n: n.º médio de moléculas; PD: Poli-dispersidade

* O resultado desta amostra difere dos restantes por motivos não determinados mas imputados à preparação da amostra, pelo que não foi tido em consideração na discussão dos resultados.

**Figura 30:** Curvas de Eluição para as amostras obtidas a partir da extração alcalina com soluções de NaOH a 10%.

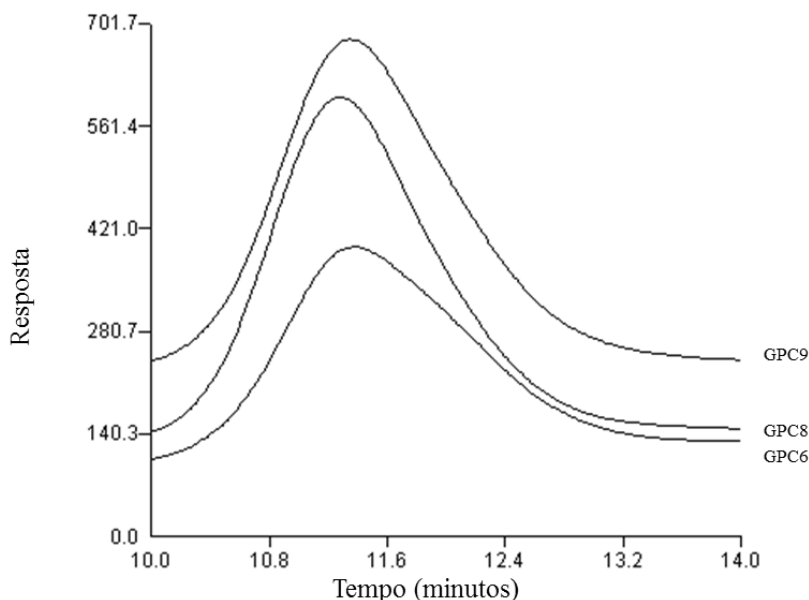


Figura 31: Curvas de Eluição para as amostras obtidas a partir da extração alcalina com soluções de NaOH a 5%.

Ficou demonstrado que o peso molecular das amostras de xilanas extraídas da pasta branca kraft de *E. globulus* é inferior ao da xilana da madeira nativa desta espécie cerca de 21% a 45%, com valores que oscilaram entre os 20100-23100 Da, comparativamente aos 25600-36300 Da já determinados em trabalhos anteriores (14, 15) para as xilanas da madeira.

Ao comparar o peso molecular ponderado das várias amostras de xilanas extraídas apresentado na Tabela 15 e, apesar de não haver diferenças significativas no peso molecular médio ponderado das diferentes amostras de xilanas, o das xilanas extraídas com NaOH 5% foi menor que o das xilanas para as amostras extraídas com NaOH 10%. Para além disso, para ambos os cenários extractivos de concentração de NaOH, o peso molecular médio aumentou ligeiramente até às 2 horas de extração alcalina, tempo a partir do qual começou a decrescer. Poder-se-á concluir que a partir das 2 horas, o risco de degradação e conversão em derivados com menor peso molecular das xilanas é maior.

Esta degradação e conversão em derivados com menor peso molecular ocorre parcialmente, tal como na reação de *peeling* do cozimento kraft, pela clivagem aleatória

das ligações glicosídicas dos polissacarídeos promovido pela hidrólise alcalina (21), aqui mostrado esquematicamente na Figura 32.

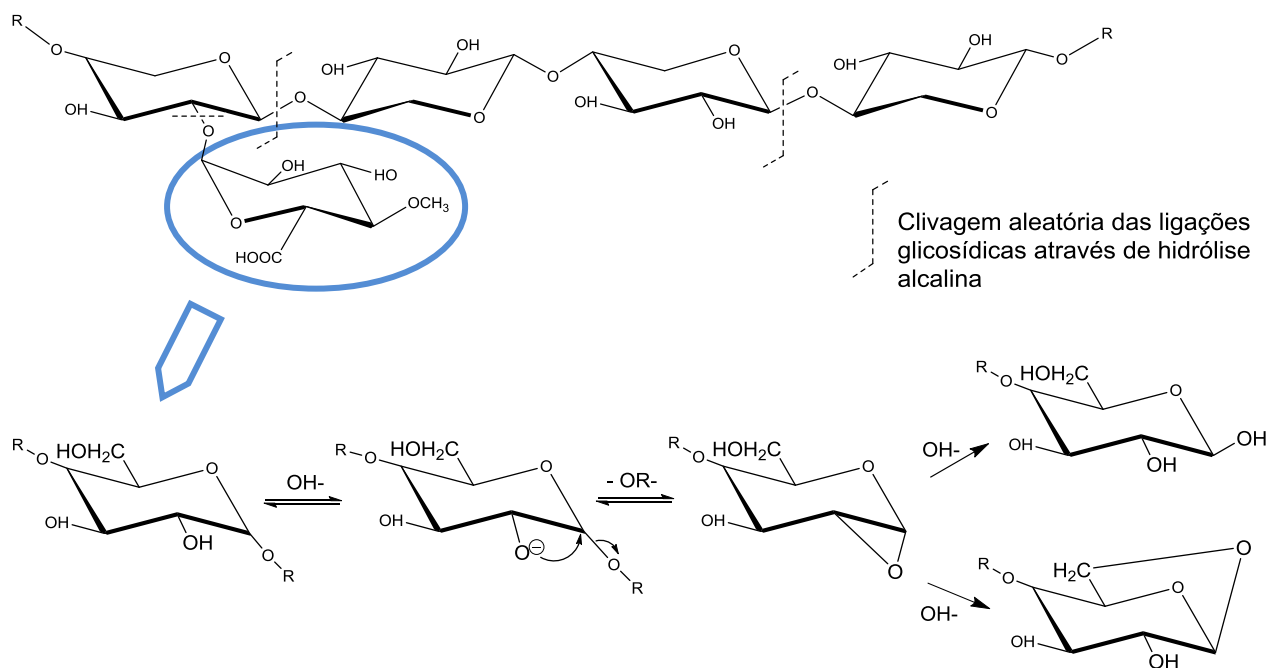


Figura 32: Mecanismo da hidrólise alcalina da ligação glicosídica (10).

Os resultados obtidos na determinação do peso molecular ponderado médio das amostras de xilanas, quando comparados com os obtidos na avaliação da variação, ao longo do tempo, do teor de remoção de pentosanas da pasta branca kraft do *E. globulus* na extração alcalina, apresentam coerência e permitem aferir os teores de xilanas removidos determinados e a partir dos quais foi sugerido que, para ambas as soluções com diferentes concentrações de NaOH, a velocidade de degradação atinge o seu mínimo entre a 1 hora e as 2 horas.

4. Conclusões

4.1. Conclusões gerais

O perfil da extração alcalina das xilanas da pasta branca kraft do *E. globulus* com o qual se alcançou a melhor taxa de solubilidade/rendimento das xilanas foi utilizando uma concentração de NaOH 10% durante 1 hora. O perfil foi otimizado com os parâmetros onde se encontrou o equilíbrio entre a velocidade de extração e a velocidade de degradação, considerando a eventual rentabilidade do processo à escala industrial. As condições de extração escolhidas consideraram os consumos do reagente alcalino e o tempo de extração a partir do qual não se justifica o prolongamento da reação de extração.

No âmbito da produção de NMC, porque diferentes teores de xilanas na pasta levam ao processamento de diferentes produtos de valor acrescentado, foi também estudado o tempo de reação de extração com NaOH 5% que apresentou uma taxa de remoção das xilanas de cerca de 70% do máximo utilizando NaOH 10%.

Os resultados obtidos com a caracterização química das amostras de xilanas, quando comparadas as diferentes metodologias seguidas (hidrólise ácida e metanólise ácida) apresentaram coerência e permitiram aferir o seu elevado grau de pureza. Para tal a diálise de todas as amostras de xilanas teve um forte contributo.

Na análise dos monossacarídeos neutros foi determinado um teor de xilose acima dos 93% em todas as amostras. Para além de xilose, as amostras resultantes da extração com NaOH 10% apresentaram teores de glucose compreendidos entre 2.3% e 6.5% e não apresentaram quaisquer teores de outros açúcares. Os teores de glucose nas amostras de xilanas extraídas com NaOH 5% foram menores, para além destas amostras terem apresentado teores de galactose, ainda que vestigiais. Estes valores foram confirmados com metanólise ácida das amostras selecionadas o que permitiu concluir acerca do elevado grau de pureza das xilanas isoladas e da sua previsível co-precipitação das β - e γ -celulose nas amostras extraídas com NaOH 10%.

A caracterização estrutural através de RMN ^1H , permitiu concluir acerca da concordância dos desvios químicos independentemente dos parâmetros da extração alcalina. Foram confirmados os desvios químicos para a região expandida dos prótons

anoméricos, sendo dominada por sinais de prótons constituintes da cadeia polimérica principal da xilana, para além das estruturas MeGlcA e MeGlcA-2Gal. Estas estruturas, com excepção dos desvios químicos dos carbonos do MeGlcA-2Gal, foram confirmadas através da caracterização estrutural com RMN de ^{13}C e por comparação com os desvios assinalados na literatura referentes aos carbonos constituintes das ligações internas dos fragmentos (1→4)- β -D-xilosilo da 4-O-metil- α -D-glucuronoxilana da madeira do *E. globulus*. Da análise por TOCSY foi possível correlacionar os prótons referentes à cadeia polimérica principal da xilana e o espectro de HSQC permitiu correlacionar as ressonâncias dos seus carbonos.

A análise da estrutura das amostras de xilanas pela técnica de RMN mostrou uma abundância relativa das unidades ramificadas superior (mais do dobro) à obtida com o método da metanólise ácida. Esta diferença quantitativa nos teores dos grupos urónicos sugere, por um lado, uma maior acessibilidade das unidades estruturais relevantes de ácidos urónicos solúveis em D_2O para a caracterização estrutural com RMN e, por outro, uma metanólise não totalmente eficaz.

A análise SEC permitiu concluir que quanto maior é a concentração da solução de NaOH, maior o peso molecular médio das amostras extraídas. Para além disso, os resultados sugerem que a velocidade de degradação das xilanas atinge o seu mínimo nas 2 horas de reacção de extração, tempo a partir da qual o peso molecular baixa, devido ao maior risco de degradação e conversão em derivados com menor peso molecular.

4.2. Trabalho futuro

Com a caracterização química e estrutural das amostras de xilanas extraídas com diferentes tempos e com concentrações de NaOH 5% e 10% e análise comparativa com a estrutura das xilanas da madeira nativa do *E. globulus* foi obtida informação relevante para a investigação e desenvolvimento de possíveis aplicações das xilanas da pasta branca kraft do *E. globulus* (tal qual e/ou modificadas) na indústria papelreira e não papelreira, dando um forte contributo para trabalhos associados a decorrer em simultâneo e trabalhos futuros de pertinência a considerar, perspectivando a nível nacional utilizações industriais alternativas às aplicações papelreiras convencionais. As xilanas

extraídas da pasta tal qual e/ou os derivados das xilanas obtidos por modificação química apresentam propriedades diferentes o que leva a um leque diferenciado de possíveis aplicações a explorar em áreas tão distintas como sistemas de embalagens alimentares, revestimento para papel *offset*, hidrogéis, nutrição, cosmética e farmacêutica.

5. Referências Bibliográficas

1. Pinto, P. C., Evtuguin, D. V., Neto, C.P. Effect of Structural Features of Wood Biopolymers on Hardwood Pulping and Bleaching Performance, *Ind. Eng. Chem. Res*, 44: 9777-9784, 2005.
2. Evtuguin, D., Neto, C.P.. Química de Polímeros: componentes Macromoleculares da Madeira. Coimbra, Imprensa da Universidade. Cap 5; 2004.
3. Krassing, A.H.; Cellulose, Structure, Accessibility and Reactivity vol. 11: Gordon and Breach Science Publishers; 1993.
4. Sixta, H., Handbook of pulp. Vol. 1., Weinheim: WILEY-VCH; (2006).
5. Evtuguin, D., Pascoal Neto, C. Recent advances in Eucalyptus Wood Chemistry: structural features through the prism of technological response, *Proceedings of 3rd International Colloquium of Eucalypt Pulp (ICEP)*, 2007, Sec 2, 1-12.
6. Pinto, P. C., Evtuguin, D. V., Pascoal Neto, C. Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft pulping. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 60, 489-497.
7. Sixtra, H., Rutkowska, E.W. Comprehensive kinetic study on kraft pulping of *Eucalyptus globulus*. Parte I, papel, 68(2), 54-67 (2007).
8. D'Almeida, M.L.O., Tecnologia de Fabricação da pasta celulósica, SENAI, IPI, Vol. 1, (1981).
9. Disponível eletronicamente em: www.crq4.org.br/sms/files/file/dc417.pdf; consultado em Janeiro de 2014.
10. Fengel, D., Wegener G. Reactions in alkaline medium in: Wood Chemistry, ultrastructure, reactions, 1st edition, N. York. USA, (1984).
11. Atalla, R. H., Hackney, J. M., Uhlin, I., Thompson, N. S. Hemicelluloses as structure regulators in aggregation of native cellulose. *International Journal Biological Macromolecules*, 1993, 15 (2), 109-112.

12. Ebringerová, A., Structural diversity and application potential of hemicelluloses in: *Macromolecular Symposia - Hemicelluloses*, Fischer K., Heinze, T., Eds, Wiley-VCH, Wiesbaden, Germany, vol. 232, 1-12, (2006).
13. Janzon, R., Saake, B., Jurgen, P. Upgrading of paper-grade pulps to dissolving pulps by nitren extraction: properties of nitren extracted xylans in comparison to NaOH and KOH extracted xylans, *Celulose*, **2008**; 15: 161-175.
14. Shatalov, A., Evtuguin, D. V., Neto, C.P. (2-O- α -D-Galactopyranosyl-4-O-methyl- α -D-glucurono)-D-Xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research*, **1999**, 320, 93-99.
15. Evtuguin, D. V., Tomas, J. L., Silva, A. M. S., Neto, C.P Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research*, **2003**; 338: 597-604.
16. Lisboa, S. A., Evtuguin, D. V., Neto, C.P, Characterization of non-cellulosic glucans in *Eucalyptus globulus* Labill. *Wood and kraft pulp*, *Holzforschung*; 61: 478-482 (2007).
17. Fernandes, D.L.A., Perreira, S.R., Serafim, L., Evtuguin, D.V. and Xavier, A.M.B. Chapter 6. Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics and Hardwood Sulphite Spent Liquor. In: “Bioethanol”, Marco A. P. Lima (Ed.), INTECH (open access publisher), 123-152 (2012).
18. Sjostrom, E. *The Structure of Wood* In: *Wood Chemistry – Fundamentals and applications*, Academic Press, San Diego, USA, (1981).
19. Hon, D. N.-S., Shiraishi N. *Wood and cellulosic chemistry*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; (2007).
20. Ohlsson, K. A., Carbonation of wood ash recycled to a forest soil as measured by isotope ratio mass spectrometry. *Soil Science Society of America Journal*, **2004**; 64(6): 2155-2161.
21. Sjöström, E., *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*. 2nd edition. Finland: Academic Press; (1993).

22. Clayton, D., Easty, D., Einspahr, D., Lonsky, W., Malcom, E., McDonough, T., Schroeder, L., Thompson, N. – Chemistry of Alkaline Pulping. Pulp and Paper Manufacture-Alkaline Pulping. *Joint Executive Committee of the Vocational Educational Committees of the Pulp and Paper Industry*. **1989**, 5. 1.
23. Biermann, C. J. – Handbook of Pulping and Papermaking. 2nd ed. San Diego: Academic Press, (1996).
24. Carvalho, M.G.V.S. – Efeito das Variáveis de Cozimento nas Características Químicas de Pasta kraft de *Eucalyptus globulus*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra: Tese de Doutoramento, (1999).
25. Lisboa, S.A., Evtuguin, D.V., Neto, C.P., Goodfellow, B. J. Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. *Carbohydrate Polymers*, **2005**; 60, 77–85.
26. Neto, C.P, Silvestre, A. J. D., Evtuguin, D.V.,Freire, C. S. R., Pinto, P. C. R., Santiago, A. S. Bulk and surface composition of ECF bleached hardwood kraft pulp fibres, *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, **2004**; 19, 513-520.
27. Pinto, P.C., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Silvestre, A. J. D., Behaviour of *Eucalyptus globulus* lignin during kraft pulping. I. Analysis by chemical degradation methods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 22: 93-108 (2002).
28. Daniel, A. I. D., Neto, C.P, Evtuguin, D.V., Silvestre, A. J. D., Hexenuronic acid contentes of *Eucalyptus globulus kraft* pulps: variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability, *TAPPI JOURNAL* **2003**; 2, 3-8.
29. Agneta, F., Krogerus, Bjorn, Xylan from bleached hardwood pulp – new opportunities. *TAPPIEngineering, Pulping & Environmental Conference*, **11-14/10/2009**; 1-8.
30. Pinto, P.C., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Silvestre, A. J. D., Chemical composition and structural features of the macromolecular components of plantation Acacia mangium wood, *J.Agric. Food Chem.*, **2005**; 53: 7856-7862.

31. Browning, B.L., *Methods of wood chemistry*, Wiley, New York, 396-397, (1997).
32. Peng, X., Bian, J, Li, M, Xiao, X., Xia, X., Yin, W., Sun, R., Graded Ethanol Fractionation and structural characterization of alkali-extractable hemicelluloses from *Olea europea* L., *Bio-Resources*, **2013**, 8(1): 1110-1123.
33. Laine, C., Hartman, J. Vana-Nissi, M., Hydroxyalkylated xylans in coatings for packaging and paper, *Industrial Crops and Products*, **2012**; 44: 692-704.
34. Rebutzi, F., Evtuguin, D.V., Effect of glucuronoxylan on the hornification of *Eucalytus globulus* bleached pulps, *Macrom. Symp.*, **2006**, 232: 121-128.
35. Marques, G., Gutiérrez, A., Río, J., Evtuguin, D.V., Acetylated heteroxylan from Agave sisalan and its behaviour in alkaline pulping and TCF/ECF bleaching, *Carbohydrate Polymers*, **2010**; 81: 517-523.
36. Gonçalves, V.M.F., Evtuguin, D.V., Domingues, M.R Structural characterization of the acetylated heteroxylan from the natural hybrid *Paulownia elongata*/*Paulownia fortunei*, *Carbohydrate Research*, **2008**; 343: 256-266.
37. Petzold-Welcke, K., Schwikal, K., Daus, S., Heinze, T., Xylan derivatives and their application potential, *Carbohydrate Polymers*, **2014**; 100: 80-88.
38. Chirat, C., Lachenal, D., Sanglard M., Extraction of xylans from hardwood chips prior to kraft cooking, *Process Biochemistry*, **2012**; 47: 381-385.

6. Apêndices

Anexo A – Exemplos de Cálculo**A.1 Determinação de massa de amostra em base seca necessária nas pesagens**

$$W = \frac{\text{massa}_{\text{que se pretende pesar}} - \text{massa}_{\text{em base seca}}}{\text{massa}_{\text{que se pretende pesar}}} \times 100\%$$

$$\text{massa}_{\text{que se pretende pesar}} = \frac{\text{massa}_{\text{em base seca}}}{1 - \frac{W}{100}}$$

É determinada a massa de amostra necessária a um dado ensaio (contabilizando a humidade presente na mesma), que corresponde ao valor em base seca.

A.2 Cálculo do rendimento (η)

$$\eta = \frac{\text{massa}_{\text{pasta depois da extração}}}{\text{massa}_{\text{pasta (matéria-prima)}}} * 100$$

A.3 Teor de Pentosanas na pasta (após extração) em relação à matéria-prima

$$\text{Teor de pentosanas na pasta após extração} = \frac{\text{Pentosanas na pasta após extração}}{\text{Pentosanas na matéria-prima}} * \eta$$

Anexo B – Tabelas de Resultados

Nesta secção apresentam-se os dados finais relevantes para o tratamento dos resultados obtidos.

- **Definição do perfil de extração alcalina**

Tabela B.1: Massas necessárias (corrigida base seca) ao cálculo do rendimento das extracções alcalinas da pasta branca kraft do *E. globulus* com diferentes concentrações de soluções NaOH (%) durante 2 horas.

| [Sol. NaOH], % (durante 2 horas) | Massa inicial (g) | Massa final (g) | Rendimento p/p pasta extraída (%) |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------|--------------------------------------|
| 4% | 12,5 | 11,01 | 88,1 |
| 6% | | 10,09 | 80,7 |
| 8% | | 10,88 | 87,0 |
| 10% | | 9,49 | 75,9 |
| 12% | | 9,58 | 76,6 |
| 14% | | 11,55 | 92,4 |

- **Definição do tempo de reação da extração alcalina**

Tabela B.2: Massas necessárias (corrigida base seca) ao cálculo do rendimento das extracções alcalinas da pasta branca kraft do *E. globulus* com concentração 10 % de solução NaOH durante diferentes tempos (h).

| Tempo de extração, h (com sol. NaOH 10%) | Massa inicial (g) | Massa final (g) | Rendimento (%) |
|---|-------------------|-----------------|----------------|
| 0,25 | 12,5 | 9,92 | 79,4 |
| 0,50 | | 9,88 | 79,0 |
| 1 | | 9,70 | 77,6 |
| 2 | | 9,78 | 78,2 |
| 3 | | 9,74 | 77,9 |

Tabela B.3: Massas necessárias (corrigida base seca) ao cálculo do rendimento das extracções alcalinas da pasta branca kraft do *E. globulus* com concentração 5 % de solução NaOH durante diferentes tempos (h).

| Tempo de extração, h (com sol. NaOH 5%) | Massa inicial (g) | Massa final (g) | Rendimento (%) |
|--|-------------------|-----------------|----------------|
| 0,50 | 12,5 | 10,38 | 83,0 |
| 1 | | 10,38 | 83,0 |
| 2 | | 10,42 | 83,4 |
| 3 | | 10,08 | 80,6 |

- **Determinação do Teor de Pentosanas (corrigida com o rendimento de extração e tendo por base o Teor de Pentosanas da matéria-prima)**

Tabela B.4: Teor de Pentosanas na pasta branca kraft do *E. globulus* refinada 66° SR (matéria-prima) extraída com diferentes concentrações de soluções NaOH (%) durante 2 horas e Teor de Pentosanas removido.

| [Sol. NaOH], % (durante 2 horas) | Pentosanas (%) | Teor de Pentosanas na pasta em relação à matéria-prima (A, %) | Teor de Pentosanas removido (B=100-A, %) |
|-------------------------------------|-------------------|---|--|
| Sem extração (Matéria-prima) | 16,9 | --- | --- |
| 4% | 11,7 | 61,0 | 39,0 |
| 6% | 6,8 | 32,5 | 67,5 |
| 8% | 4,0 | 20,6 | 79,4 |
| 10% | 1,9 | 8,5 | 91,5 |
| 12% | 1,5 | 6,8 | 93,2 |
| 14% | 3,1 | 16,9 | 83,1 |

Tabela B.5: Teor de Pentosanas na pasta branca kraft do *E. globulus* refinada 66° SR (matéria-prima) extraída em meio alcalino NaOH 10% com diferentes tempos e Teor de Pentosanas removido.

| Tempo de extração, h (com sol. NaOH 10%) | Pentosanas na pasta (%) | Teor de Pentosanas na pasta em relação à matéria-prima (A, %) | Teor de Pentosanas removido (B=100-A, %) |
|---|-------------------------------|---|--|
| Sem extração (Matéria-prima) | 16,9 | --- | --- |
| 0,25 | 4,55 | 21,4 | 78,6 |
| 0,50 | 2,65 | 12,4 | 87,6 |
| 1 | 2,43 | 11,2 | 88,8 |
| 2 | 1,9 | 8,8 | 91,2 |
| 3 | 2,8 | 12,9 | 87,1 |

Tabela B.6: Teor de Pentosanas na pasta branca kraft do *E. globulus* refinada 66° SR (matéria-prima) e depois da extração com meio alcalino NaOH 5% com diferentes tempos e Teor de Pentosanas removido.

| Tempo de extração, h (com sol. NaOH 5%) | Pentosanas na pasta (%) | Teor de Pentosanas na pasta em relação à matéria-prima (A, %) | Teor de Pentosanas removido (B=100-A, %) |
|--|-------------------------------|---|--|
| Sem extração (Matéria-prima) | 16,9 | --- | --- |
| 0,50 | 7,5 | 36,9 | 63,1 |
| 1 | 7,6 | 37,3 | 62,7 |
| 2 | 7,5 | 37,0 | 63,0 |
| 3 | 7,5 | 35,8 | 64,2 |

Anexo C – Figuras Auxiliares

Nesta secção apresentam-se os espectros de massa das unidades estruturais dos açúcares metilados das amostras de xilanas seleccionadas.

C.1. Espectros de massa das unidades estruturais dos açúcares metilados das amostras de xilana extraída com NaOH 5%; 30 min.

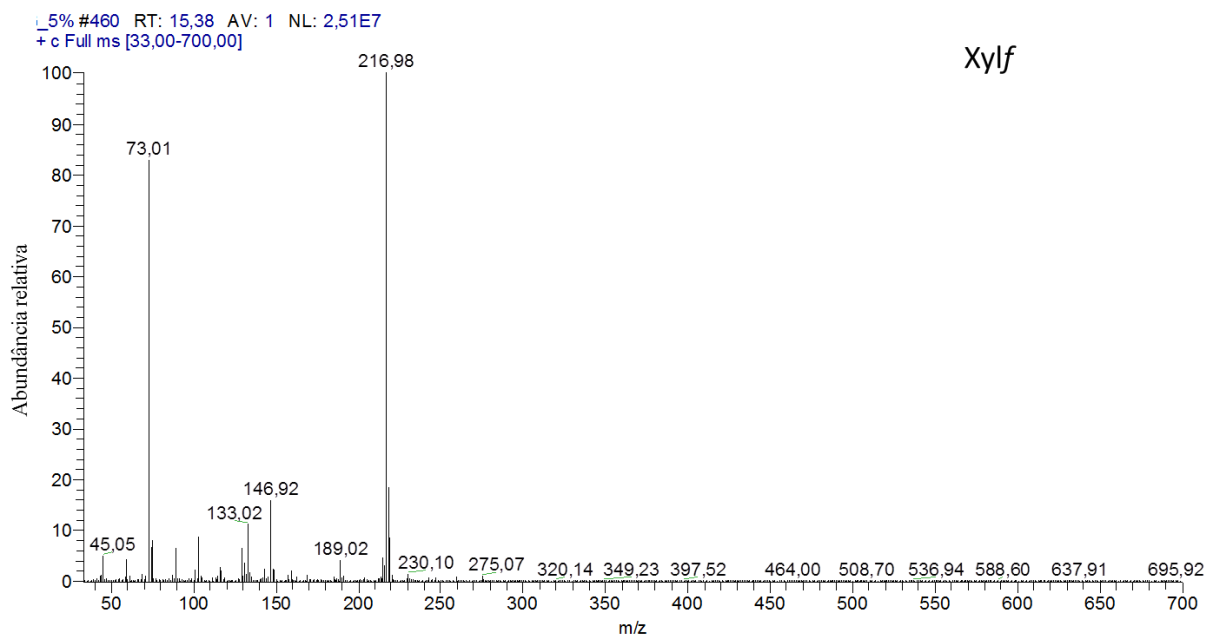


Figura C.1.1: Espectro de Massa da unidade estrutural Xylf

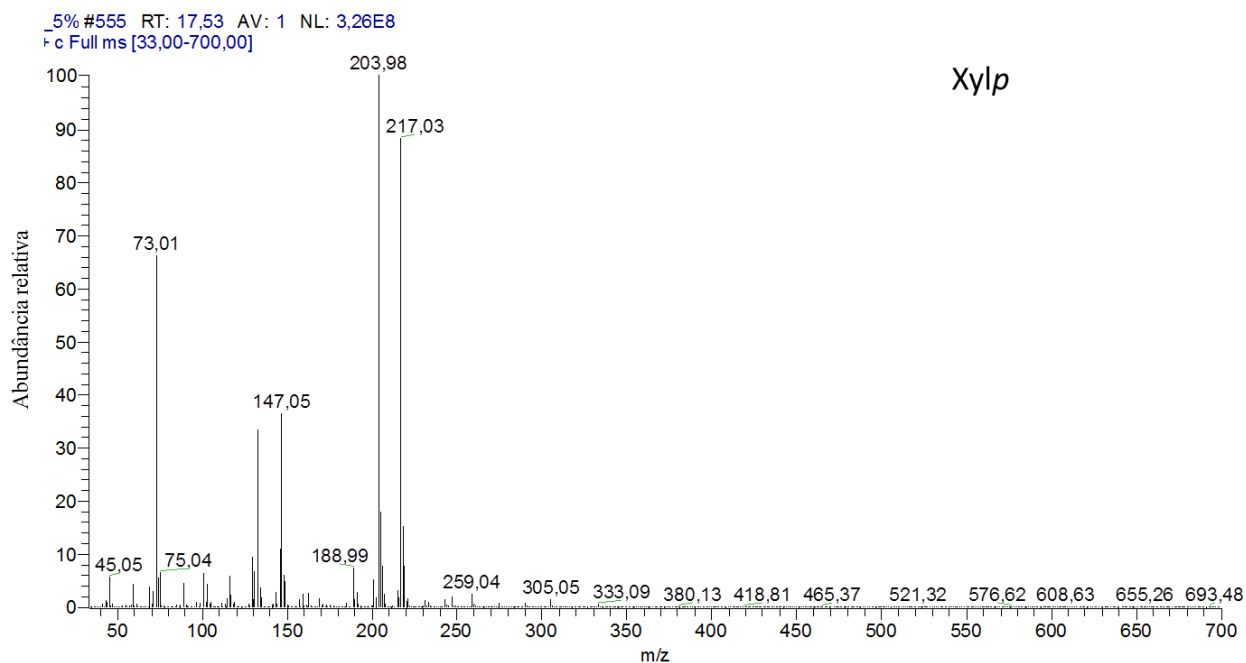


Figura C.1.2: Espectro de Massa da unidade estrutural Xylp

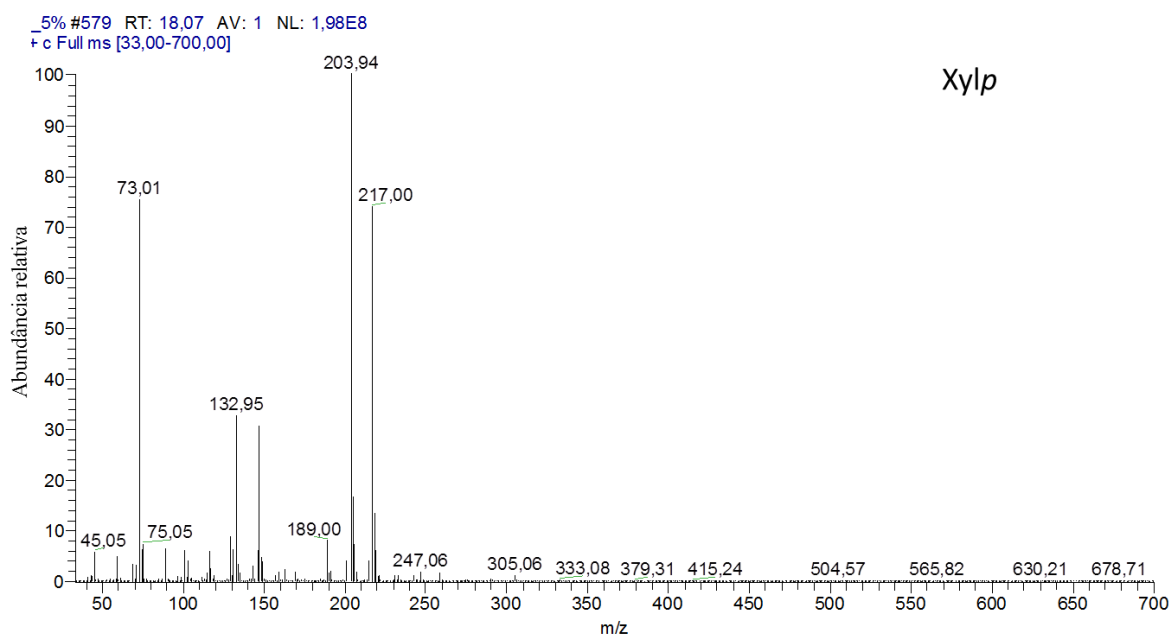


Figura C.1.3: Espectro de Massa da unidade estrutural Xylp

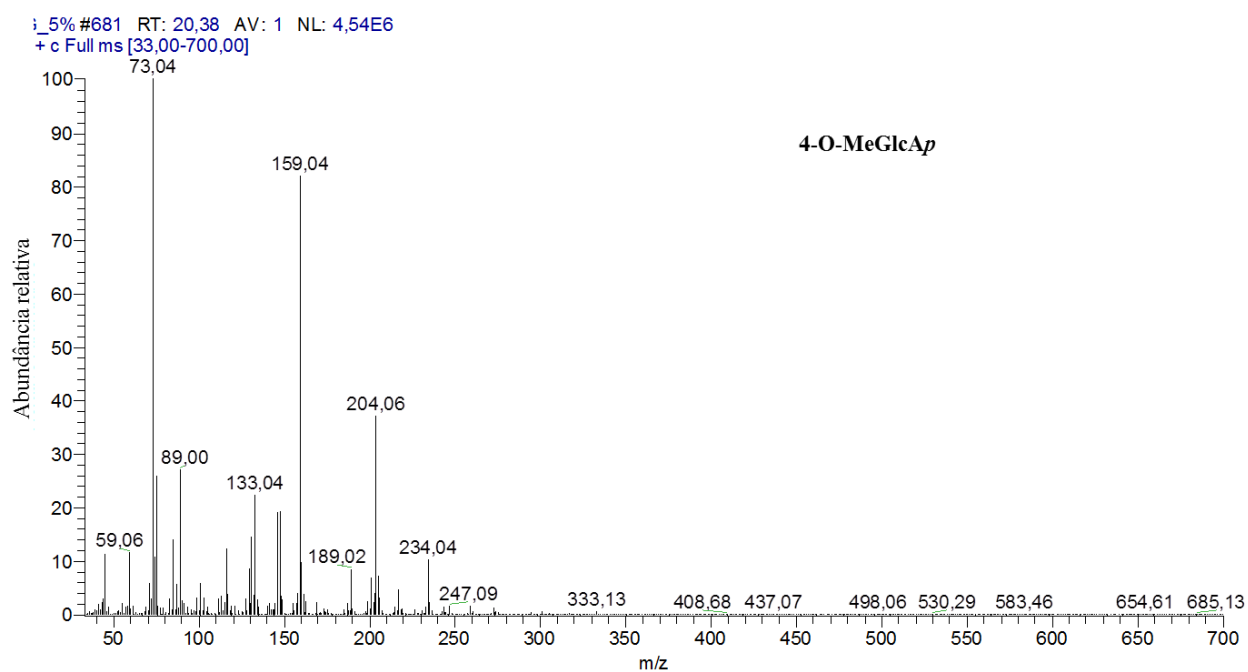


Figura C.1.4: Espectro de Massa da unidade estrutural 4-O-MeGlcA.

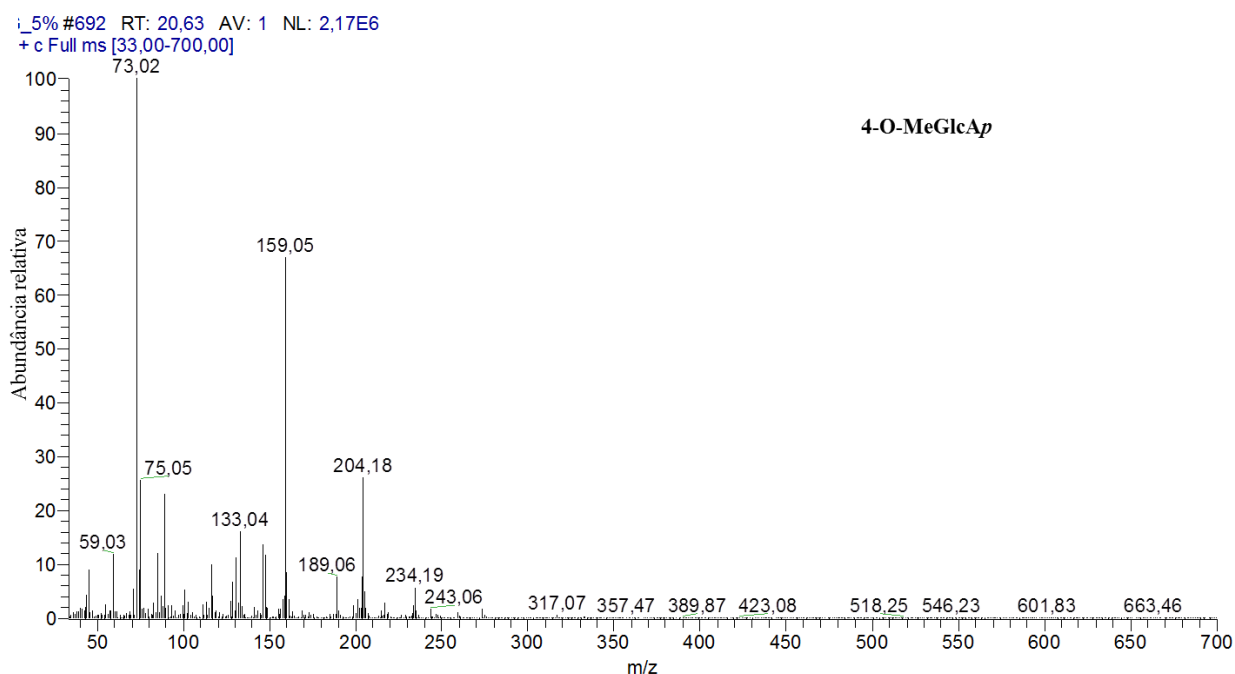


Figura C.1.5: Espectro de Massa da unidade estrutural 4-O-MeGlcA.

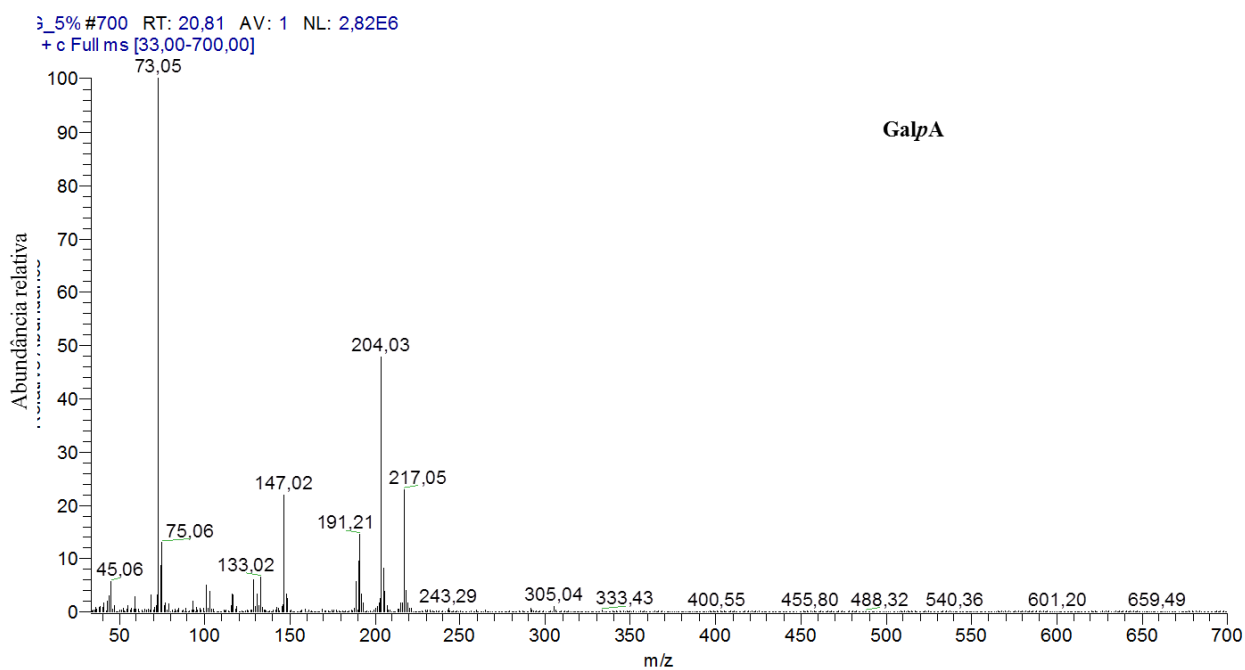


Figura C.1.6: Espectro de Massa da unidade estrutural GalpA

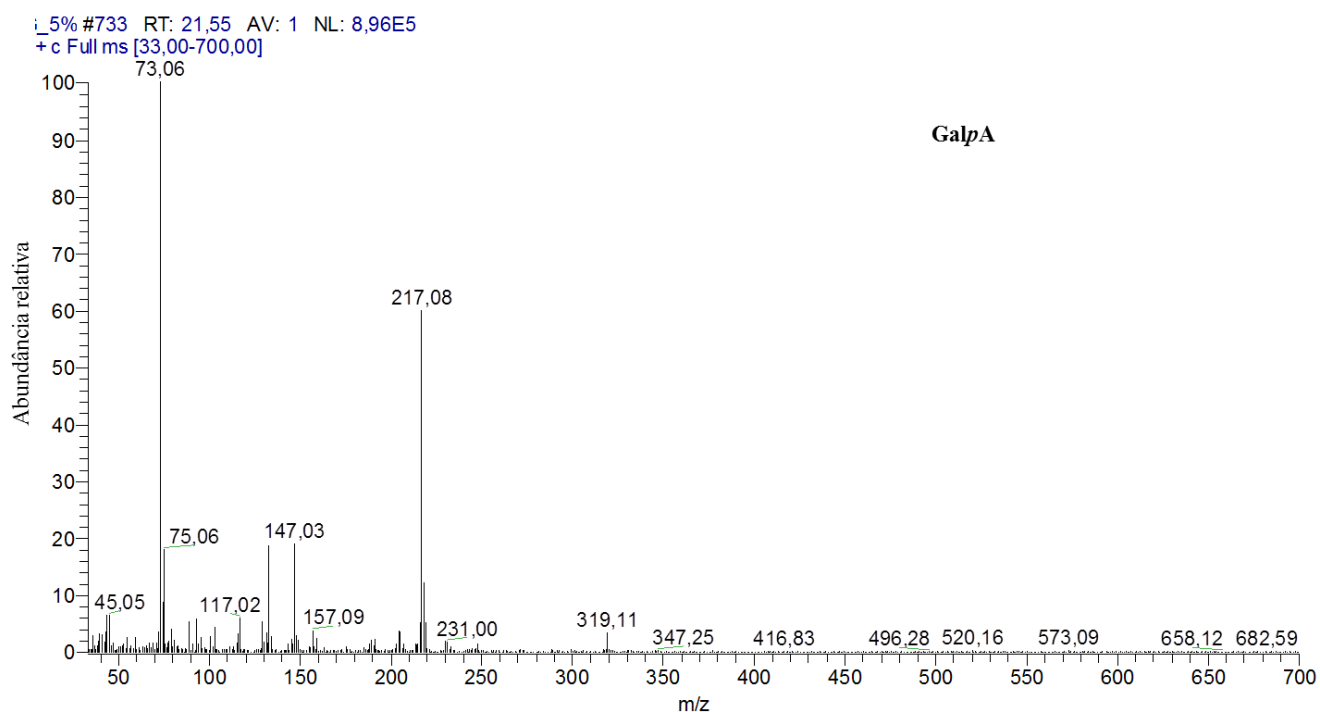


Figura C.1.7: Espectro de Massa da unidade estrutural GalpA

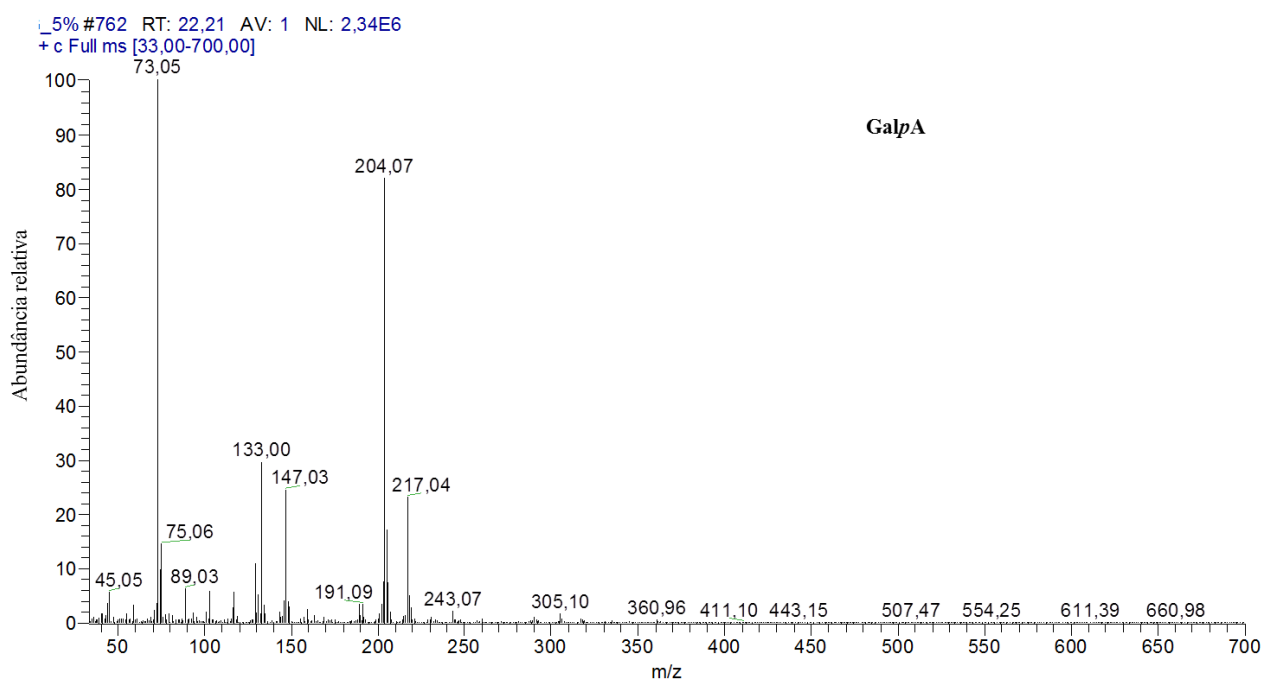
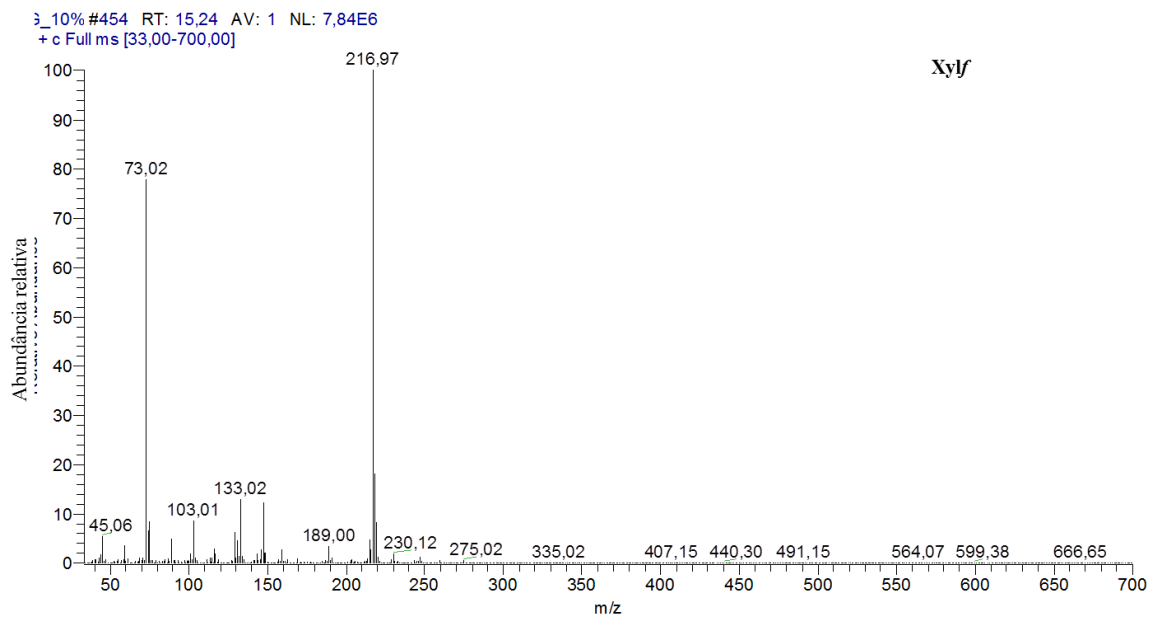
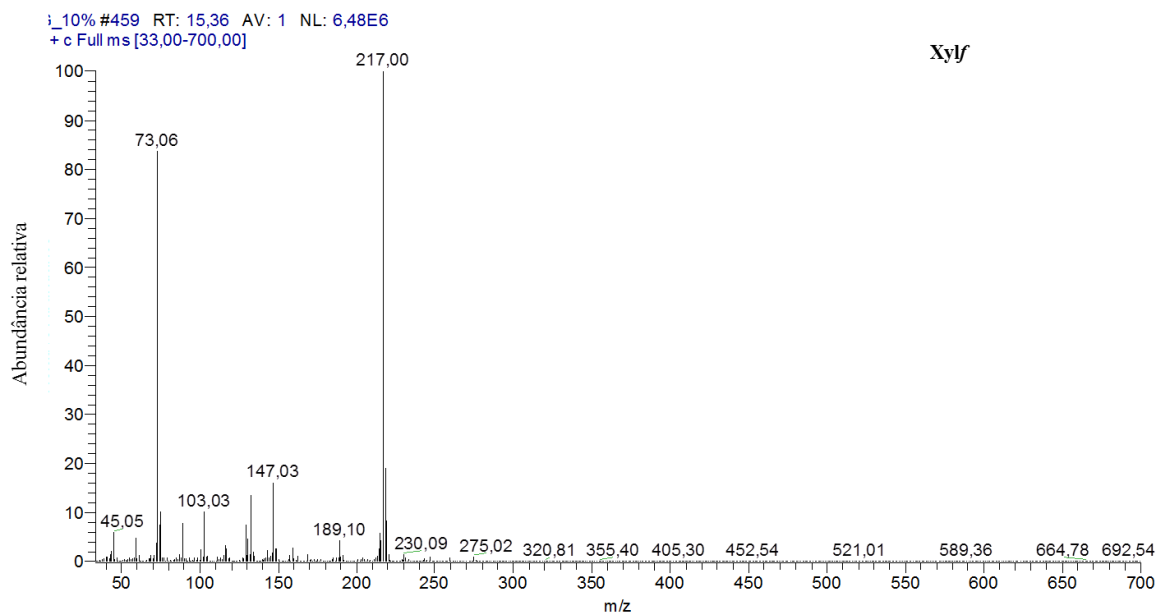


Figura C.1.8: Espectro de Massa da unidade estrutural GalpA

C.2. Espectros de massa das unidades estruturais dos açúcares metilados das amostras de xilana extraída com NaOH 10%; 15 min.**Figura C.2.1:** Espectro de Massa da unidade estrutural Xylf**Figura C.2.2:** Espectro de Massa da unidade estrutural Xylf

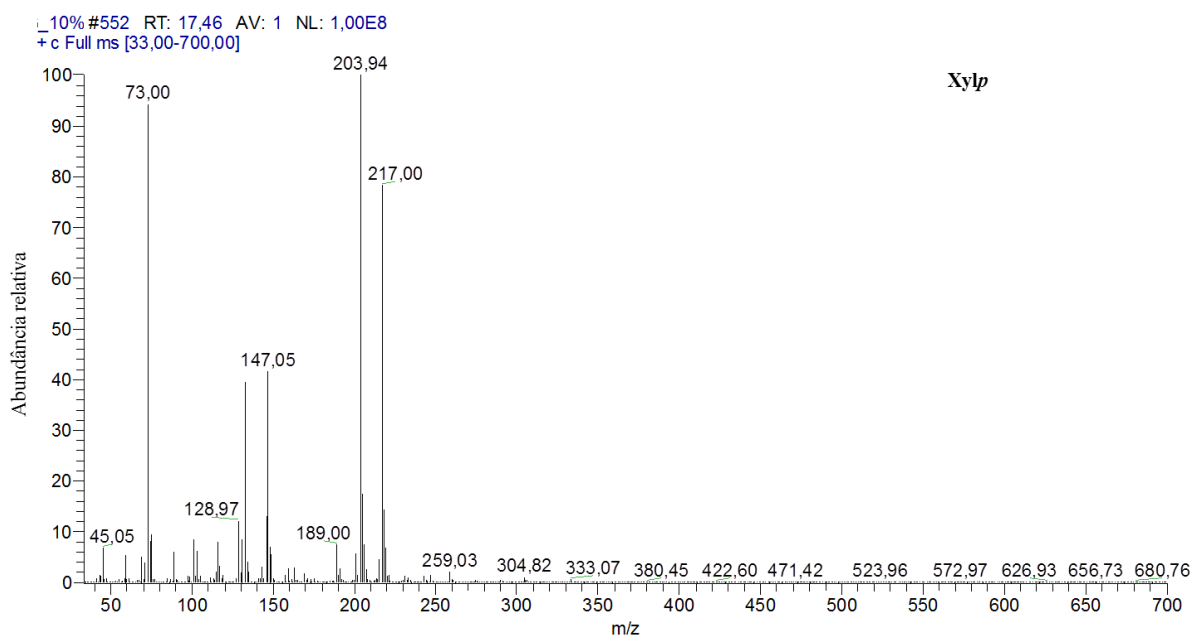


Figura C.2.3: Espectro de Massa da unidade estrutural Xylp

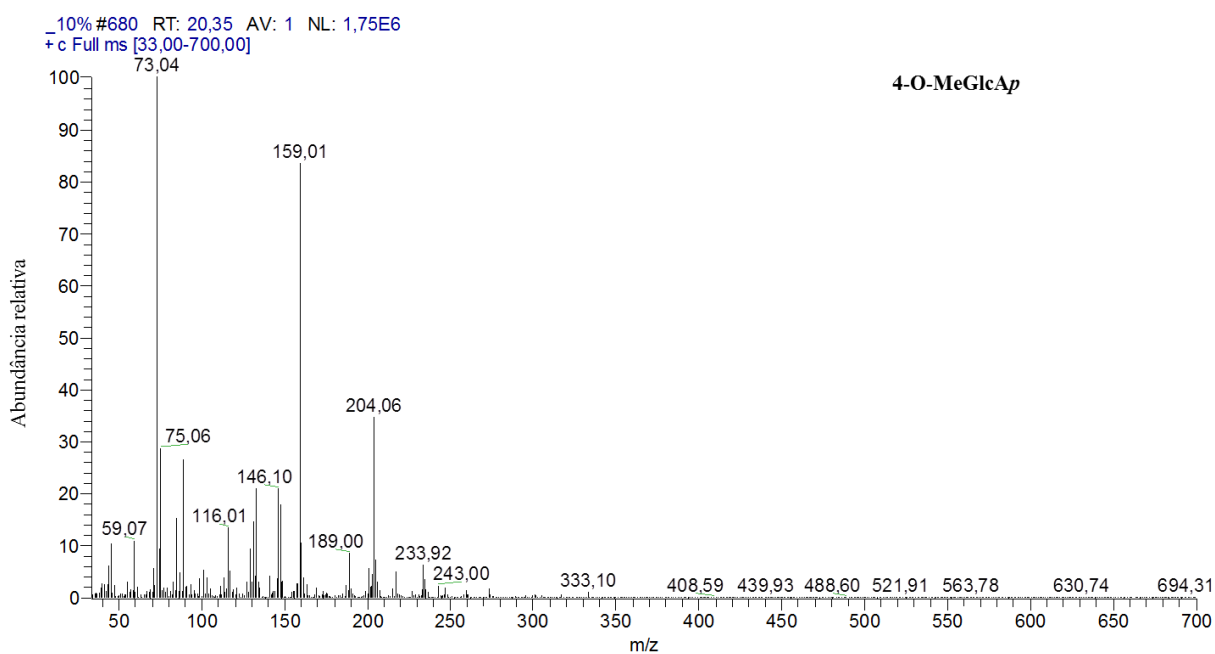


Figura C.2.4: Espectro de Massa da unidade estrutural 4-O-MeGlcAp

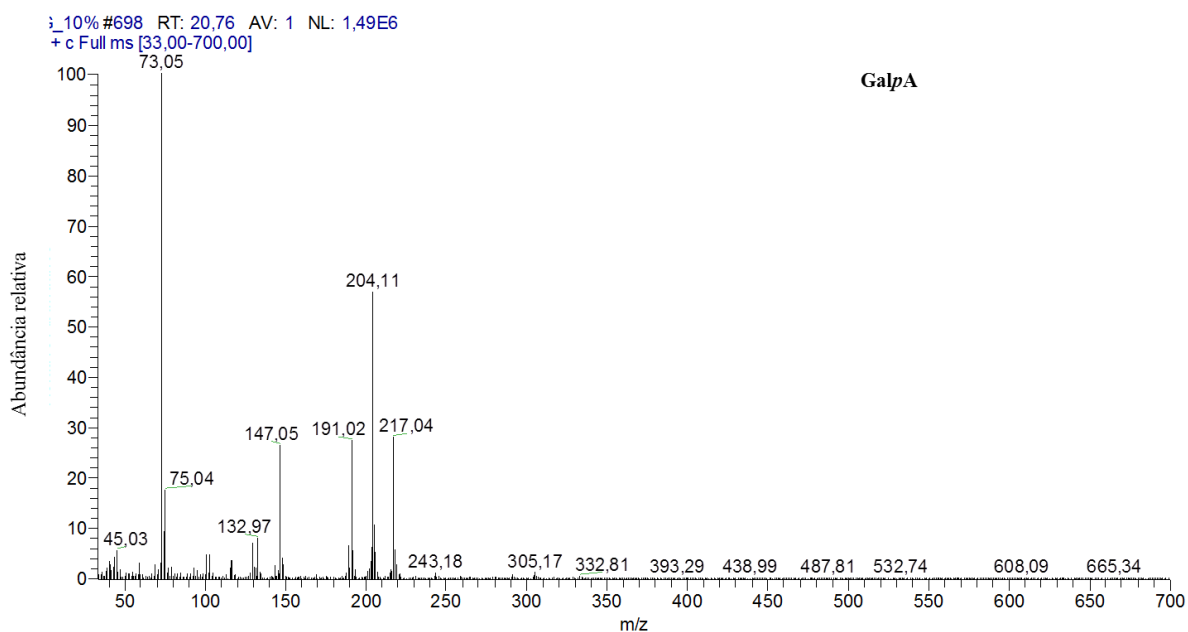


Figura C.2.5: Espectro de Massa da unidade estrutural GalpA

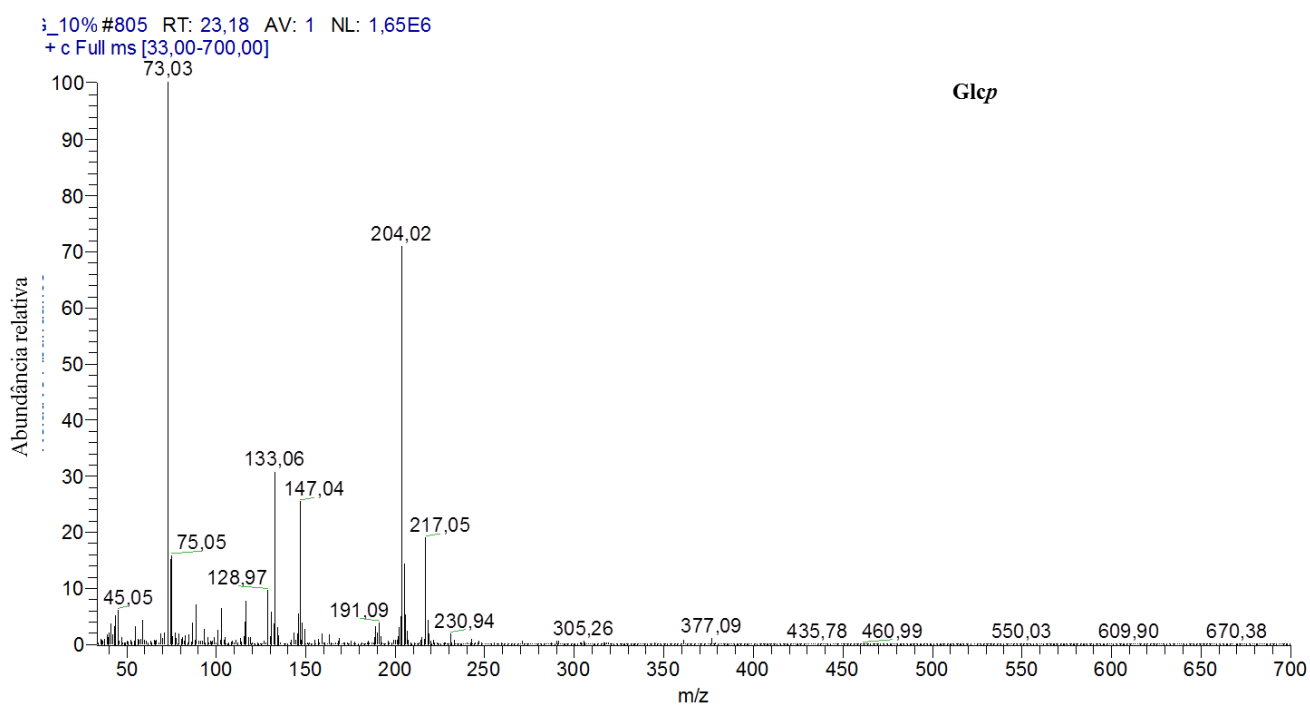


Figura C.2.6: Espectro de Massa da unidade estrutural GlcP