



**Sara Alexandra Sousa
Fonseca**

Tratamento enzimático de pasta kraft de *Eucalyptus globulus* como estratégia inovadora no processo de branqueamento



**Sara Alexandra Sousa
Fonseca** **Tratamento enzimático de pasta kraft de *Eucalyptus globulus* como estratégia inovadora no processo de branqueamento**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação de Engenheiro António Paulo Mendes de Sousa, Especialista no RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e Papel.

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha irmã

o júri

presidente

Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Paula Mora Tavares
Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Engenheiro António Paulo Mendes de Sousa
Especialista no Raiz - Instituto de Investigação da Floresta e do Papel

agradecimentos

Gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento:

Em primeiro lugar aos orientadores deste trabalho, a Professora Ana Xavier e o Engenheiro Mendes de Sousa. Muito obrigado pela disponibilidade e orientação na elaboração desta tese e por todo o conhecimento transmitido.

Ao RAIZ por permitir a realização deste trabalho nos seus laboratórios e, em especial, a todos os colaboradores pela enorme ajuda e disponibilidade demonstrada durante o período de trabalho no RAIZ.

À Doutora Ana Paula Mora Tavares e à sua aluna Dámaris, pela ajuda nos ensaios de laboratório relativos à determinação da atividade enzimática da lacase.

Às minhas colegas de casa Marisa, Ana Raquel e Laura que foram uma grande ajuda para que a mudança/permanência em Aveiro fosse mais fácil.

À Ana Patrícia, pela amizade, pela ajuda e sobretudo pelo incentivo e confiança que me ajudou a nunca desistir.

Aos meus pais, que tanto se esforçaram para que chegasse ao fim desta etapa. Obrigado pela dedicação e pela força que me deram. Sem dúvida que sem o incentivo deles, nada disto teria sido possível.

palavras-chave

Biobranqueamento, xilanases, lacase, *Eucalyptus globulus*, pastas kraft

resumo

A indústria papelreira tem vindo a adaptar-se às várias imposições ambientais nomeadamente na área do branqueamento, devido ao uso tradicional de compostos clorados e ao seu impacto no ambiente. Por este motivo foram já desenvolvidas duas técnicas que restringem a utilização de cloro: ECF (Elemental Chlorine Free) – técnica de branqueamento livre de cloro elementar e TCF (Total Chlorine Free) - técnica de branqueamento totalmente livre de compostos clorados. Em reforço destas duas abordagens (ECF e TCF) também tem sido estudada a aplicação de enzimas como pré-tratamento para o processo de branqueamento.

Este trabalho teve como objetivo explorar o efeito conjunto de dois tipos de enzimas em atuação simultânea no pré-tratamento das pastas.

Realizou-se o pré-branqueamento de pastas kraft de *Eucalyptus globulus* recorrendo a enzimas xilanases e lacase, tendo como objetivo a redução da utilização dos reagentes químicos clorados.

As xilanases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, que provocam a hidrólise das xilanas, tornando assim a lenhina mais acessível para o posterior branqueamento químico da pasta crua de celulose. Foram utilizados dois preparados enzimáticos comerciais com atividade de endo-xilanases: *Serzym 90* produzida pela Sertec20 e *NS-51121* produzida pela *Novozymes*.

A lacase é uma oxiredutase que promove a oxidação da lenhina residual da pasta crua, facilitando deste modo a sua remoção posterior no branqueamento. Neste caso, foi apenas utilizado um preparado enzimático comercial fornecido pela *Novozymes* – *NS-51003*.

Estas enzimas foram aplicadas como pré-tratamento, constituindo o primeiro estágio de uma sequência de branqueamento com dióxido de cloro em pastas kraft cruas de *Eucalyptus globulus*. Depois da aplicação das enzimas seguiu-se o estágio de oxidação do dióxido de cloro (D_0) e, por último foi feita uma extração alcalina com reforço de peróxido de hidrogénio (Ep).

O efeito das enzimas foi avaliado pelo ensaio padrão de brancura ISO (ISO 2470-1 2016), medindo o grau de brancura desenvolvido nas pastas e pelo ensaio do índice kappa que indica o grau de deslenhificação das pastas tratadas.

O objetivo do trabalho foi cumprido, tendo-se conseguido uma diminuição do reagente oxidante, dióxido de cloro, de 25% não se reduzindo o grau de brancura final das pastas branqueadas.

keywords

Biobleaching, xylanases, laccase, *Eucalyptus globulus*, kraft pulp

abstract

The paper industry has been adapting to the increasing restrictions of the environmental legislation, particularly concerning the bleaching process and its effluents, due to the traditional use of chlorinated compounds and their impact on environment.

For this reason, the pulp and paper industry has already developed two techniques that restrict the use of chlorine: ECF (Elemental Chlorine Free) – bleaching technique free of elemental chlorine and TCF (Total Chlorine Free) – bleaching technique totally free of chlorinated compounds. In reinforcement to these approaches (ECF and TCF), the industry has also been studying the application of enzymes for cellulosic pulps pre-treatment before the traditional bleaching process.

The objective of this study was to study the effect of two types of enzymes acting simultaneously on the pre-treatment of the pulps.

In this work xylanases and laccase were used as pre-bleaching treatment of the unbleached kraft *Eucalyptus globulus* pulps in order to reduce the chlorinated chemical reagents.

Xylanases are enzymes belonging to the hydrolases group, which cause hydrolysis of xylans, making the lignin more accessible to the subsequent chemical bleaching process of the unbleached pulps. Two commercial products with endo-xylanases activity: *Serzym 90* produced by *Sertec20* and *NS-51121* produced by *Novozymes*, were used in this work.

Laccase is an oxireductase which causes oxidation of the residual lignin from the unbleached pulp, thereby facilitating its removal in the subsequent bleaching process. In this case, just one commercial enzymatic product was used – *NS-51003*, produced by *Novozymes*.

These two enzymatic products were applied as a pre-treatment, constituting the first stage in a bleaching sequence with chlorine dioxide for kraft unbleached pulps of *Eucalyptus globulus*. After this application, chlorine dioxide was used in the oxidation stage, D_0 , followed by an alkaline extraction stage reinforced with hydrogen peroxide (Ep).

The effect of the enzymes in the pulps was evaluated by the ISO brightness standard (ISO 2470-1 2016), measuring the degree of brightness developed in the pulps, and the kappa number assay, that indicates the degree of delignification of the treated pulps.

The objective of this work was fulfilled and a decrease of 25% in the consumption of oxidizing chlorinated reagent, chlorine dioxide, was achieved without decreasing the degree of brightness of the final bleached pulps.

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Constituição da madeira	3
2.1.1. Celulose	3
2.1.2. Hemiceluloses	4
2.1.3. Lenhina	6
2.1.4. Compostos extratáveis	8
2.2. Processos de produção de pasta de papel	8
2.2.1. Cozimento kraft	11
2.3. Branqueamento.....	12
2.3.1. Questões ambientais	13
2.3.2. Técnicas de branqueamento.....	13
2.3.3. Biobranqueamento	16
2.3.3.1. Xilanases	16
2.3.3.2. Lacases	18
3. Materiais e métodos	21
3.1. Materiais.....	21
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Atividade enzimática	22
3.2.1.1. Determinação da atividade enzimática de xilanases	22
3.2.1.2. Determinação da atividade enzimática da lacase	22
3.3. Tratamento das pastas cruas.....	23
3.3.1. Determinação do teor de secura.....	24
3.3.2. Determinação do Índice kappa	24
3.3.3. Refletância / Brancura	25
3.3.3.1. Formação das folhas de pasta.....	26
3.3.3.2. Leitura da refletância / Brancura.....	26
3.4. Biobranqueamento	27
3.4.1. Extração com hidróxido de sódio	28
3.4.2. Estágio X – aplicação de enzimas.....	28
3.4.3. Estágio D ₀ : de Aplicação de dióxido de cloro	28
3.4.3.1. Determinação da concentração do dióxido de cloro	29

3.4.3.2. Cloro residual	30
3.4.4. Estágio E ₁ - Extração alcalina.....	30
3.4.4.1. Determinação da concentração de peróxido de hidrogénio	31
3.5. Análise das pastas branqueadas.....	32
3.5.1. Índice micro-kappa	32
4. Resultados e discussão.....	35
4.1. Atividade enzimática.....	35
4.1.1. Atividade inicial das Xilanases.....	35
4.1.2. Atividade inicial da Lacase.....	35
4.2. Biobranqueamento	36
4.2.1. Xilanases.....	37
4.2.2. Lacase	40
4.2.2.1. Pasta 1	40
4.2.2.2. Filtrado	42
4.2.2.3. Pasta 3	43
4.2.2.4. Pasta 4	45
4.2.3. Efeito complementar.....	48
4.2.3.1. Pasta 1	48
4.2.3.2. Pasta 4	49
4.2.4. Redução de dióxido de cloro.....	51
5. Conclusão.....	53
6. Bibliografia	55
Anexo A: exemplos de cálculo.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Compostos macromoleculares em madeiras de folhosas e resinosas.....	3
Tabela 2 - Tipos de cozimento químico de acordo com os reagentes utilizados e o meio em que o cozimento ocorre.....	10
Tabela 3 - Condições de aplicação do dióxido de cloro no processo de branqueamento	14
Tabela 4 - Classificação Lachenal and Muguet dos agentes de branqueamento.....	15
Tabela 5 - Valores tabelados do fator de correção, f.....	25
Tabela 6 - Condições dos ensaios para cada uma das etapas realizadas	27
Tabela 7 - Tabela-resumo de todas as sequências de ensaios realizados para cada uma das enzimas.....	32
Tabela 8 - Valores de atividade enzimática do preparado enzimático de lacase NZ-51003	36
Tabela 9 - Resultados obtidos no biobranqueamento da Pasta 1 com preparados enzimáticos de xilanases Serzym 90 e NS-51121	38
Tabela 10 - Resultados obtidos no biobranqueamento da Pasta 1 com preparado enzimático de lacase NZ-51003	40
Tabela 11 - Resultados de atividade enzimática da lacase (com e sem solução tampão) na presença de filtrado e de água com acerto de pH	42
Tabela 12 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 3 sem extração com hidróxido de sódio	44
Tabela 13 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 3 após extração com hidróxido de sódio	44
Tabela 14 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 4 sem extração com hidróxido de sódio	46
Tabela 15 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 4 após extração com hidróxido de sódio	46
Tabela 16 - Resultados obtidos no branqueamento da Pasta 1 com preparado enzimático de xilanases e de lacase	48
Tabela 17 - Resultados obtidos no branqueamento da Pasta 4 com preparado enzimático de xilanases e de lacase	50
Tabela 18 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de xilanase e de lacase, da Pasta 1 com redução de ClO ₂	51

Tabela 19 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de xilanases e de lacase, da Pasta 4 com redução de ClO ₂	52
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura da celulose.....	4
Figura 2 - Açúcares das hemiceluloses	5
Figura 3 - Hemicelulose característica da madeira folhosa, O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana.....	5
Figura 4 - Hemicelulose característica da madeira resinosa, O-acetilgalcatoglucomanana	6
Figura 5 - Modelo proposto para a lenhina	7
Figura 6 - Monómeros de repetição da lenhina	8
Figura 7 - Tipos de cozimento mais utilizados para produção de pasta e nível mundial em 2014	9
Figura 8 - Produção mundial das pastas químicas em 2014.....	10
Figura 9 - Representação gráfica da percentagem de celulose e hemicelulose dissolvidos em função do processo de deslenhificação durante as três fases (fase inicial, fase bulk e fase final) do cozimento kraft.....	11
Figura 10 - Mecanismo geral da reação de oxidação da lacase.....	19
Figura 11 – Diagrama do processo da sequência de branqueamento D ₀ -E ₁ -D ₁ -D ₂	21
Figura 12 - Amostras de folhas formadas com a pasta branqueada	26
Figura 13 - Mecanismo de atividade da estrutura de isotiazolinona	37
Figura 14 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total, no branqueamento da Pasta 1, com dois preparados enzimáticos de xilanases (Serzym90 e NS-51121)	39
Figura 15 - Gráfico da brancura obtida em função da percentagem de ClO ₂ utilizado...41	
Figura 16 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento da Pasta 1 com o preparado enzimático de lacase NZ-51003.....	41
Figura 17 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento, com preparado enzimático lacase NZ-51003, da Pasta 3 após extração com hidróxido de sódio	45
Figura 18 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento da Pasta 4 com preparado enzimático de lacase NZ-51003 1 1% de H ₂ O ₂	47
Figura 19 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento, com preparado enzimático de lacase NZ-51003 e de xilanases NS-51121, da Pasta 1	49

Figura 20 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento, com preparado enzimático de lacase NZ-51003 e de xilanases NS-51121, da Pasta 450

Nomenclatura

a	Volume de dióxido de cloro, mL
Abs	Absorvância
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico))
C	Consumo de tiosulfato
D ₀	Estágio de aplicação de dióxido de cloro
E	Massa de pasta seca
E ₁ /E _p	Estágio de extração alcalina
f	Fator de correção
f _d	Fator de diluição da enzima
ClO ₂	Dióxido de cloro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HexA	Ácido hexenurónico
IMK	Índice micro-kappa
IK	Índice kappa
lac	Preparado enzimático de lacase
M	Molaridade da solução de tiosulfato
NaOH	Hidróxido de sódio
T1 e T2	Volumes gastos na titulação, mL
t.o.d	Tonelada por grama de pasta seca
t.a.d	Tonelada por grama de pasta húmida
X	Estágio de aplicação de enzimas
xyl	Preparado enzimático de xilanases

1. Introdução

O papel teve origem na China e, ainda hoje é um dos recursos com maior utilidade. Só surgiu em Portugal muito tempo depois, mas, apesar disso, foi o primeiro país a produzir pastas químicas de eucalipto ao sulfito, em 1923, e ao sulfato, em 1957 [1].

Com o passar dos anos tem-se verificado que a produção e consumo de papel tem aumentado, e, desta forma, esta indústria revelou-se uma grande contribuição para o crescimento da economia portuguesa, uma vez que as exportações excedem as importações, tendo-se registado um volume de vendas, em 2015, correspondente a 1,5% do PIB do referido ano [2].

Em Portugal, a principal madeira utilizada para a produção de pasta e papel é o *Eucalyptus globulus*, pois devido às suas propriedades é considerada a árvore de fibra ideal para a produção de papel de impressão e escrita [3]. Esta madeira apresenta parede celular espessa e fibras curtas apresentando um elevado número por unidade de massa. Além disso é de fácil cozimento e branqueamento, devido às diferenças de estrutura e peso molecular das suas xilanas e também devido à estrutura da lenhina [4].

Um dos principais processamentos da indústria papelreira é a produção da pasta, realizada através do processo cozimento. Existem diversos tipos de cozimento, sendo o mais utilizado o processo kraft. As pastas kraft produzidas têm uma cor acastanhada e, portanto, em grande parte dos vários tipos de papéis produzidos, é necessário adquirirem a tonalidade branca, através de um processo que é denominado de branqueamento [1].

Ao longo dos anos têm-se verificado nesta indústria, algumas restrições devido às imposições ambientais causadas pelos efluentes de determinados processos deste setor, nomeadamente, o branqueamento das pastas. Este processo inicialmente era feito utilizando, como principal agente de branqueamento, o cloro elementar, Cl_2 . Com o passar dos tempos verificou-se que este composto tinha um impacto negativo a nível ambiental e, por essa razão, foi substituído pelo dióxido de cloro – ClO_2 . Este agente branqueador está incluído nas técnicas de branqueamento livres de cloro elementar – ECF. Além deste tipo de branqueamento, foi ainda criado um branqueamento totalmente livre de cloro (TCF), onde os agentes oxidantes utilizados não possuem cloro na sua constituição, como por exemplo, o oxigénio, o ozono ou o peróxido de hidrogénio.

1. Introdução

Nos últimos anos tem vindo a ser testada a aplicação de enzimas como auxiliares do branqueamento, constituindo assim uma forma de reduzir a quantidade de agentes químicos no processo. As enzimas são aplicadas nas pastas e podem ser conjugadas com branqueamento químico. Uma vez que elas facilitam muito o branqueamento, a quantidade de reagentes químicos necessárias diminui, constituindo assim uma alternativa viável e mais ecológica.

Neste trabalho foram aplicados dois tipos de enzimas diferentes a pastas de *Eucalyptus globulus*, nomeadamente xilanases (hidrolases), e lacases (oxirredutases), no branqueamento com dióxido de cloro, com o objetivo de se conseguir reduzir a quantidade necessária deste. Este estudo foi realizado no *RAIZ- Instituto de Investigação para a Floresta e Papel*. Esta organização, que foi criada em 1996 e está associado ao *The Navigator Company*, desenvolve pesquisa, consultoria, serviços especializados e treinamento em áreas de florestas, celulose e papel e é reconhecida como Organização de Pesquisa e Tecnologia do Sistema Científico e Tecnológico Português [3].

2. Revisão bibliográfica

2.1. Constituição da madeira

A madeira é uma biomassa vegetal cuja matéria orgânica é constituída essencialmente por celulose, hemiceluloses e lenhina. Estes são os três principais compostos macromoleculares da parede celular, cuja proporção varia com o tipo de madeira nomeadamente de resinosas ou folhosas, tal como mostra a Tabela 1 [5].

Tabela 1 - Compostos macromoleculares em madeiras de folhosas e resinosas. (adaptado de [5])

		Resinosas	Folhosas
Celulose, %		40-44	43-47
Hemiceluloses, %	Glucuronoxilana	5-10	15-30
	Glucomanana	15-20	2-5
Lenhina, %		25-31	16-24
Compostos extractáveis, %		2-8	1-5

Enquanto que a madeira folhosa é mais rica em celulose, a resinosa é a mais rica em lenhina. Relativamente às hemiceluloses, estas são o constituinte que apresenta uma maior distinção entre folhosas e resinosas, pois existem várias hemiceluloses e, para cada tipo de madeira, existe um tipo de hemicelulose específico que ocorre em maior percentagem. No caso das folhosas a hemicelulose mais abundante é a glucuronoxilana, enquanto que nas resinosas é a glucomanana [6].

2.1.1. Celulose

A celulose é o polissacarídeo que existe em maior percentagem na parede celular das plantas, é um polímero de cadeia longa, cuja fórmula química é $(C_6H_{10}O_5)_n$ [5].

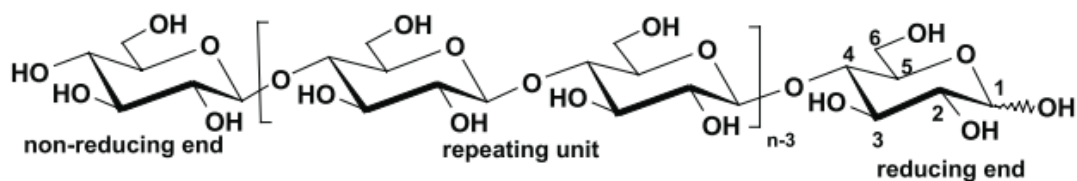


Figura 1 - Estrutura da celulose
[5]

Tal como mostra a Figura 1, a celulose é formada por uma sequência de monómeros de glucose, designados de unidades de repetição, ligados entre si por ligações β -1,4-glicosídicas, onde os grupos das extremidades, os grupos hidroxilo, apresentam diferentes comportamentos: numa das extremidades o grupo tem carácter redutor (carbono 4), enquanto que na outra (carbono 1) tem carácter não redutor [7].

Tipicamente, a celulose apresenta um grau de polimerização elevado, entre 10 000 e 15 000. Trata-se de um componente com duas regiões distintas: uma região cristalina (cerca de 50% - 90%) e uma região amorfa [8]. A forma cristalina da celulose é particularmente resistente aos ataques químicos e à degradação. Por outro lado, a zona amorfa é a que sofre mais degradação, pois grande parte das reações ocorrem nessa região, uma vez que a maior parte dos reagentes penetra na zona mais desordenada da celulose [9]. Na parede celular das plantas, as cadeias de celulose agregam-se, formando as microfibrilas, que ajudam a conferir rigidez e resistência à planta [6].

2.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos não-celulósicos, predominantemente heteropolissacarídeos, com peso molecular e cadeia muito inferiores aos da celulose. Assim, também o grau de polimerização é mais baixo, comparativamente ao da celulose, cerca de 150-200. Contrariamente à celulose, as hemiceluloses apenas possuem estrutura amorfa, o que lhes confere um elevado potencial de ligação à água, levando a que os seus grupos OH sejam mais acessíveis tornando-as mais facilmente solúveis e degradáveis. A sua maior solubilidade e suscetibilidade à hidrólise, comparativamente à celulose, são resultado das suas estruturas amorfas e baixos pesos moleculares [10].

As hemiceluloses têm na sua constituição monómeros de açúcar e são constituídas por cinco diferentes tipos de açúcares simples: glucose, manose, galactose, xilose e arabinose, como se ilustra na Figura 2 [11].

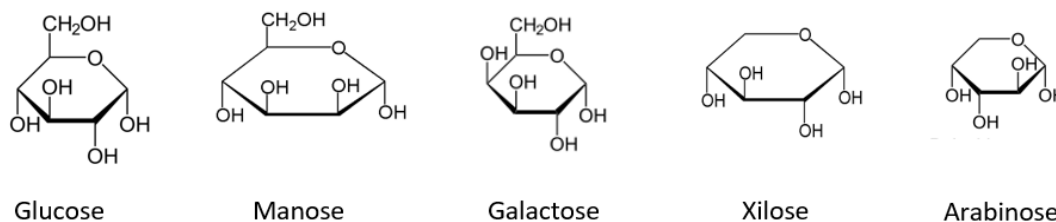


Figura 2 - Açúcares das hemiceluloses
(adaptado de [11])

De um modo geral as hemiceluloses podem ser divididas em dois grandes grupos:

- Pentosanas: hemiceluloses cuja cadeia principal é constituída por pentoses. Neste grupo estão incluídas as xilanas e arabinanas.
- Hexosanas: hemiceluloses cuja cadeia principal é constituída por hexoses, onde se encontram as mananas, as galactanas e as glucanas.

A hemicelulose característica da madeira folhosa é a glucuronoxilana. Esta é constituída por uma cadeia principal formada por xilanas, à qual estão ligados grupos de ácido 4-O-metilglucurónico, através de ligações α -(1,2)-glicosídicas. Além disso, alguns dos grupos OH das unidades de xilose, são substituídos por grupos O-acetilo, dando assim origem ao principal constituinte hemicelulósico da madeira folhosa (10%-35%), o O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana, ou glucuronoxilana (Figura 3) [5].

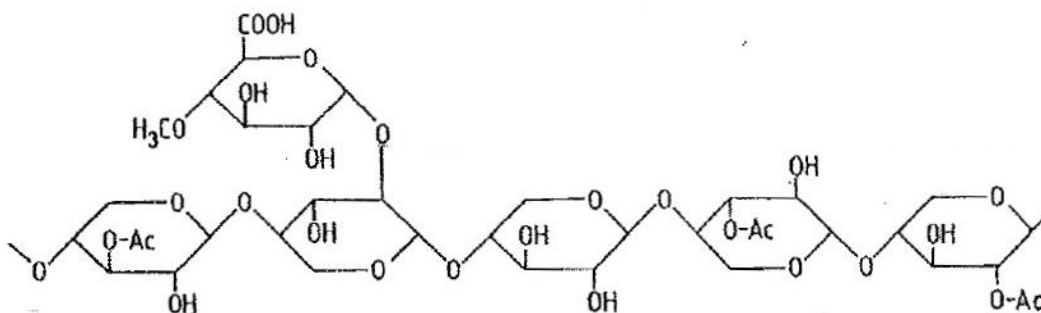


Figura 3 - Hemicelulose característica da madeira folhosa, O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana
[5]

No caso da madeira resinosa, a principal hemicelulose é a galactoglucomanana, pertencente ao grupo das hexosanas, com uma percentagem de cerca de 15-20% [10]. A cadeia principal desta hemicelulose é constituída por unidades de glucose e manose, à qual estão ligados grupos acetil, originando a hemicelulose O-acetilgalactoglucomanana (Figura 4).

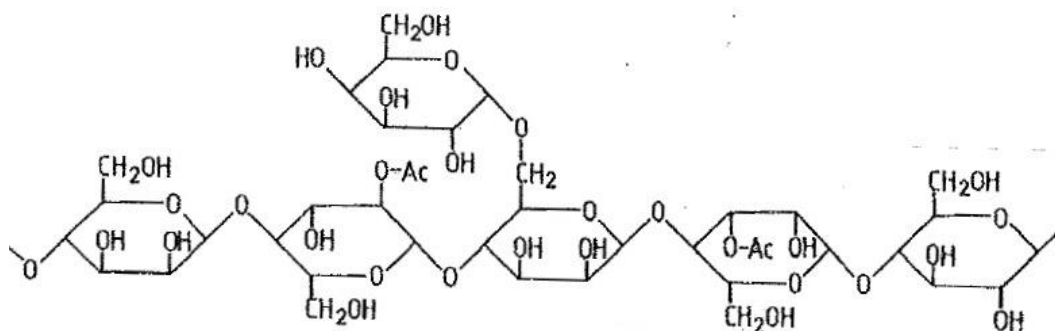


Figura 4 - Hemicelulose característica da madeira resinosa, O-acetilgalactoglucomanana [5]

2.1.3. Lenhina

A lenhina é uma macromolécula fenólica complexa com estrutura ramificada/entrecruzada (Figura 5). É o segundo componente mais abundante das plantas [5]. O grau de polimerização deste composto encontra-se no intervalo de 100-1000 [12]. Assim como as hemiceluloses, possui apenas estrutura amorfa. A sua presença tem um efeito positivo nas plantas, pois a natureza aromática das suas unidades fenólicas torna-a hidrofóbica e a sua estrutura tridimensional confere rigidez à parede celular [13].

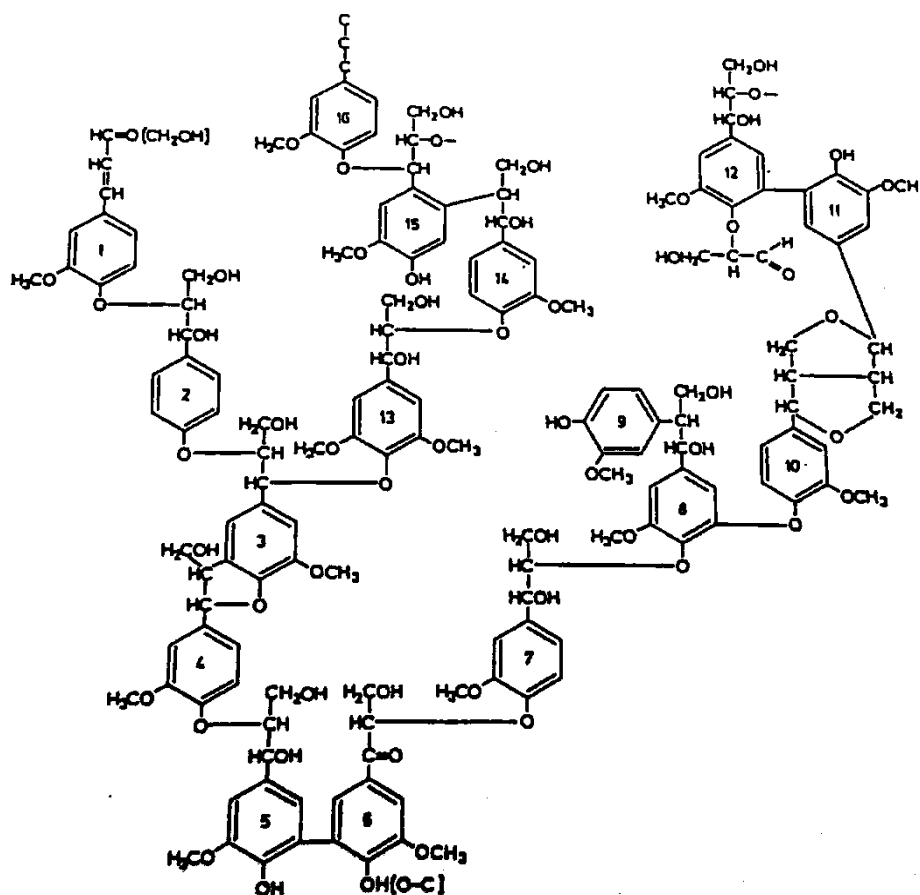


Figura 5 - Modelo proposto para a lenhina
[11]

Os monómeros de repetição que compõem a lenhina são divididos em três grupos: derivados do álcool p-hidroxicinâmico (ou p-cumarílico), derivados de álcool coniferílico e derivados de álcool sinapílico [8]. As três estruturas são apresentadas na Figura 6, onde se observa que a diferença entre elas está no número de grupos metoxilo existentes. A existência destas estruturas precursoras leva a que a lenhina possa ser classificada em três tipos – tipo G, tipo G/S e tipo H/G/S. A lenhina do tipo G existe em maiores quantidades nas madeiras resinosas. Neste tipo de lenhina, cerca de 95% - 98% são unidades guaiacilo (G) e 2% - 5% são unidades p – hidroxifenilo (H). As madeiras folhosas são do tipo G/S, onde aproximadamente 40% - 80% são unidades siringilo (S), 20% - 60% são unidades G e 4% - 10% são unidades H. O último tipo (tipo H/G/S) é característico de plantas anuais, onde existem as três unidades em quantidades equivalentes [8].

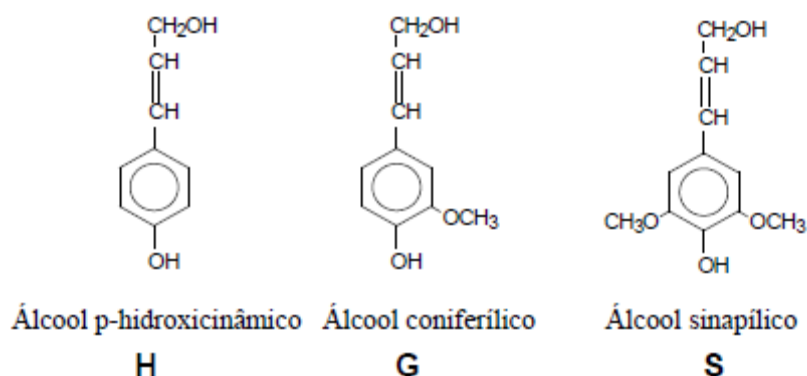


Figura 6 - Monómeros de repetição da lenhina
[8]

2.1.4. Compostos extratáveis

Os compostos extratáveis existem na madeira em pequenas quantidades, normalmente em proporções inferiores a 5% e podem ser divididos em quatro grupos: ácidos gordos, ésteres/esteroides, terpenos/terpenóides e compostos fenólicos [8].

Estes compostos podem ser extraídos da madeira, em laboratório, com solventes orgânicos ou água [5].

2.2. Processos de produção de pasta de papel

A produção da pasta de papel é feita através de um processo denominado cozimento. Este é o processo através do qual a madeira e matérias lenhocelulósicas são processadas originando uma massa fibrosa, denominada pasta de papel [14]. Existem três tipos de processos de cozimento: cozimento químico, cozimento semi-químico e cozimento mecânico:

- **Cozimento químico:** é o tipo de cozimento mais utilizado (Figura 7), de onde resultam fibras mais intactas e mais flexíveis. Os valores atingidos de rendimento de pasta são relativamente baixos (45%-60%). Isto acontece porque a deslenhificação não é um processo seletivo e, juntamente com a lenhina, há também degradação de alguma celulose e das hemiceluloses [15].

2. Revisão Bibliográfica

- Cozimento semi-químico: neste tipo de cozimento, pequenas porções de lenhina são removidas quimicamente e as fibras são separadas mecanicamente em refinadores [15].
- Cozimento mecânico: a madeira é destroçada, as cascas são trituradas e as fibras libertadas e convertidas numa pasta fibrosa denominada ‘pasta mecânica’. A separação das fibras dos restantes constituintes da madeira não é completa, obtendo-se assim uma pasta com baixa qualidade, cuja aplicação é limitada. Estas pastas têm maiores quantidades de lenhina residual do que as pastas químicas. São pastas com elevado rendimento (88%-96%) e são usadas essencialmente para jornais e revistas [15].

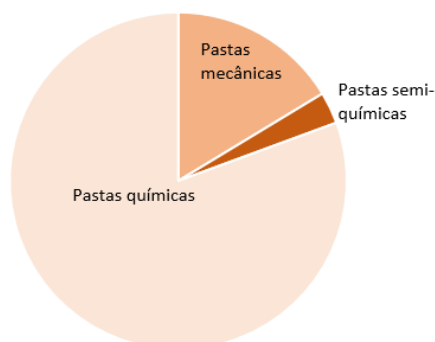


Figura 7 - Tipos de cozimento mais utilizados para produção de pasta e nível mundial em 2014 (adaptado de [16])

O gráfico da Figura 7 mostra que a grande maioria das pastas da indústria papelreira são produzidas por processos químicos. Dentro do cozimento químico podem ainda ser distinguidos cinco alternativas distintas, de acordo com os reagentes utilizados e o meio reacional em que o cozimento ocorre [16].

Tabela 2 - Tipos de cozimento químico de acordo com os reagentes utilizados e o meio em que o cozimento ocorre (adaptado de [16])

	Tipo de cozimento	Reagentes
Cozimento em meio ácido	Cozimento ao sulfito	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido sulfuroso (H_2SO_3) • Dióxido de enxofre (SO_2)
	Cozimento bissulfito	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido sulfuroso (H_2SO_3)
	Cozimento organossolve	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrogénio (H) • Solventes orgânicos
Cozimento em meio alcalino	Cozimento ao sulfato ou cozimento kraft	<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de sódio (NaOH) • Sulfureto de sódio (Na_2S)
	Cozimento com soda	<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de sódio (NaOH)

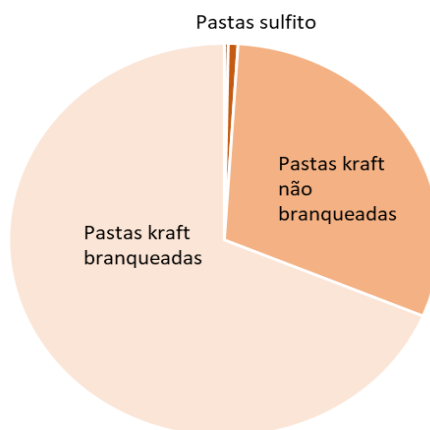


Figura 8 - Produção mundial das pastas químicas em 2014 (adaptado de [16])

Na Figura 8 está apresentado um gráfico que mostra que o tipo de cozimento químico dominante é o cozimento kraft e, grande parte das pastas resultantes são posteriormente branqueadas. Este tipo de pastas são pastas que foram submetidas ao processo de branqueamento para adquirirem brancura e serem utilizadas na produção de papel de impressão e escrita. Existem outros tipos de pastas às quais não é necessário

aplicar este processo, nomeadamente as pastas para produção de papeis de embalagem, como papel saco e cartão (pastas não branqueadas) [16].

2.2.1. Cozimento kraft

É o tipo de cozimento químico mais utilizado. Consiste na separação química das fibras da madeira e na dissolução da maior parte da lenhina contida na parede das fibras - deslenhificação. Este é um processo agressivo pois é feito num digestor a uma temperatura entre 150°C a 180°C, com valores de pH elevados (superiores a 13) durante cerca de 2-4h. Os reagentes utilizados são o hidróxido de sódio (NaOH) e o sulfureto de sódio (Na₂S). Os compostos ativos desta solução são os aniões hidróxido (OH⁻) e hidrossulfureto (SH⁻). A presença destes iões permite a aceleração da remoção de lenhina, levando à produção de uma pasta mais resistente, sendo o ião sulfureto de hidrogénio, o principal agente deslenhificante [14].

O processo de deslenhificação pode ser dividido em três principais fases: fase inicial, fase *bulk* e fase final ou residual [14]:

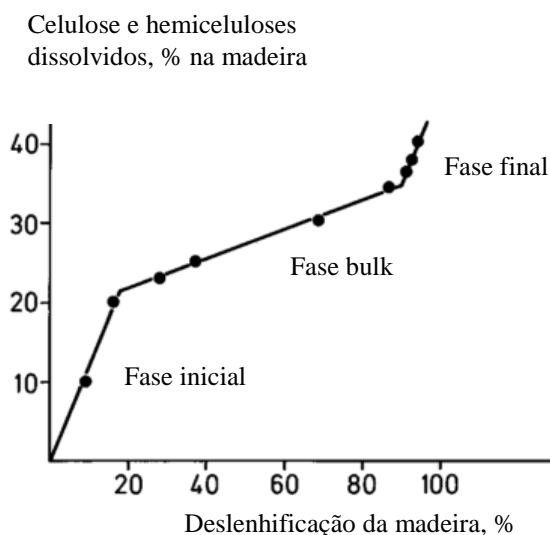


Figura 9 - Representação gráfica da percentagem de celulose e hemicelulose dissolvidos em função do processo de deslenhificação durante as três fases (fase inicial, fase *bulk* e fase final) do cozimento kraft Adaptado de [17]

Fase inicial: nesta primeira fase, ocorre remoção de cerca de 20% da lenhina presente na madeira, sendo a deslenhificação causada pela clivagem de ligações nas unidades fenólicas da lenhina. Assim como a lenhina, também cerca de 20% dos outros dois principais compostos da madeira – celulose e hemiceluloses - são dissolvidos nesta fase.

Fase *bulk*: é nesta fase que a maior parte da lenhina é removida, aproximadamente 70%, provocada pela quebra das suas ligações das unidades fenólicas e não fenólicas. Corresponde à fase de deslenhificação mais seletiva, pois é a fase em que há menor dissolução de celulose e hemiceluloses.

Fase residual: nesta fase são removidos resíduos de lenhina ainda presentes (6-8,5%) que se encontram ligados às fibras. Tal como mostra o gráfico da Figura 9, ocorre também a dissolução de grandes quantidades de hemiceluloses e alguma celulose. Por esta razão, não é possível fazer a deslenhificação total da madeira, pois o prolongamento deste processo levaria a uma maior dissolução destes compostos e à formação de uma pasta com menor qualidade. Por este motivo, no fim do cozimento, a pasta produzida ainda contém quantidades residuais de lenhina, equivalendo a valores de índice kappa de 25-30 para madeiras resinosas e 15-20 para madeiras folhosas.

A cor escura das pastas é conferida pela lenhina residual ainda presente e que será eliminada através do processo de branqueamento.

2.3. Branqueamento

Depois do cozimento, onde não é possível uma deslenhificação total, a pasta ainda contém cerca de 1,5% - 4% de lenhina residual que confere uma cor demasiado escura à pasta. Assim, os primeiros estágios de branqueamento são para remoção da lenhina residual ainda presente na pasta e os seguintes estágios são efetuados para conferir brancura às pastas, removendo-se os grupos cromóforos. Os grupos cromóforos são grupos presentes na pasta que absorvem radiação visível, conferindo uma cor escura à pasta [18].

O branqueamento é seguido pela medição da brancura ISO 2470-1 2016, definida como refletância da luz azul visível a partir de uma amostra de folhas formadas com a pasta branqueada, usando uma faixa espectral de luz com comprimento de onda de 457 nm [19].

O branqueamento é um processo que tem vindo a sofrer algumas alterações ao longo dos anos, no que diz respeito aos agentes branqueadores utilizados, devido ao impacto que estes têm sobre o ambiente.

2.3.1. Questões ambientais

O branqueamento de pastas tornou-se numa questão de grande preocupação, devido aos efluentes que resultam deste processo. Inicialmente o branqueamento era feito recorrendo a cloro elementar como agente branqueador. Com o passar do tempo, o Cl₂ acabou por ser abandonado e substituído por dióxido de cloro, uma vez que a sua utilização levava à formação de compostos organoclorados. Uma grande variedade destes compostos era formada durante as reações de cloração e a maior parte deles era libertada para a fase aquosa onde eram detetados como AOX (compostos orgânicos adsorvíveis), provocando a poluição das águas efluentes. Outra parte dos compostos orgânicos clorados permanecia na pasta branqueada e era designada como conteúdo de cloro orgânico, conhecido como OCl ou OX.

A substituição de cloro elementar por dióxido de cloro, no primeiro estágio de branqueamento (D₀) levou a que a produção de AOX se reduzisse significativamente. Esta metodologia é então uma das alternativas ao cloro elementar e, corresponde a uma técnica de branqueamento livre de cloro elementar (ECF). Além desta técnica, existe ainda outra, que consiste na realização do branqueamento das pastas sem recorrer a agentes branqueadores que contenham compostos clorados – técnica de branqueamento totalmente livre de cloro (TCF), onde se incluem outros agentes oxidantes como o ozono, o peróxido de hidrogénio e o oxigénio.

2.3.2. Técnicas de branqueamento

O processo de branqueamento abrange várias operações que ocorrem em diferentes estágios. O processo geral de branqueamento de pastas é feito através de uma determinada sequência de aplicação de agentes oxidantes de branqueamento intercalada com processos de extração alcalina (D₀-E₁-D₁-E₂-D₂). Os principais agentes branqueadores, são o oxigénio, o dióxido de cloro, o ozono, o peróxido de hidrogénio e o hipoclorito.

- Branqueamento com oxigênio (O₂):

É geralmente uma técnica de pré-branqueamento e de deslenhificação. A nível ambiental, é uma alternativa vantajosa, pois é um reagente não poluente. No entanto a deslenhificação com oxigênio não é um processo seletivo e, por isso, aquando da remoção da lenhina, são também degradadas a celulose e hemiceluloses, o que provoca diminuição da resistência da pasta [20].

- Branqueamento com dióxido de cloro (ClO₂):

Este agente é um oxidante forte e reage com a lenhina sem degradação significativa das celulose e hemiceluloses. Foi o substituto do cloro elementar (Cl₂), pois tem elevada seletividade tanto para remoção de lenhina (deslenhificação), como para a oxidação das estruturas cromóforas (branqueamento), tornando-o assim um dos agentes de branqueamento mais completo. O primeiro estágio com dióxido de cloro age mais como estágio de deslenhificação e é comumente chamado de estágio D₀. Geralmente, o processo de branqueamento tem ainda mais dois estágios com este agente branqueador, denominados D₁ e D₂, tornando assim o branqueamento mais eficiente [20]. Na Tabela 3 estão apresentadas as condições de cada um dos três estágios, D₀, D₁ e D₂.

Tabela 3 - Condições de aplicação do dióxido de cloro no processo de branqueamento (Adaptado de [20])

	D ₀	D ₁	D ₂
Consistência, %	9-13		
Tempo, min	30-60	60-180	
Temperatura, °C	40-70	55-75	60-85
pH	2-3	3-4	3,5-4,5

- Branqueamento com ozono (O₃):

O ozono é um poderoso agente oxidante e, tal como o oxigênio é uma técnica de branqueamento totalmente livre de cloro, logo não há formação de compostos organoclorados. No entanto, é um gás instável, o que dificulta a sua aplicação na indústria

e possui uma seletividade de deslenhificação significativamente inferior à do dióxido de cloro, degradando simultaneamente com a lenhina, celulose e hemiceluloses [15].

- Branqueamento com peróxido de hidrogénio (H_2O_2):

O peróxido de hidrogénio é geralmente utilizado no fim das sequências de branqueamento, pois é um bom agente branqueador, conseguindo remover ainda alguma lenhina residual [15].

- Branqueamento com hipoclorito de sódio (NaOCl):

O hipoclorito reage principalmente por oxidação e é mais seletivo do que o cloro elementar, mas menos do que o dióxido de cloro. Neste caso é importante que se mantenha o pH da solução acima de 8, pois abaixo deste valor o hipoclorito está em equilíbrio com grandes quantidades de ácido hipocloroso o qual tem enorme poder de oxidação dos hidratos de carbono, ou seja dos polissacáridos celulose e hemiceluloses [21].

Seguindo a classificação de *Lachenal and Muguet* [19], os agentes de branqueamento são classificados de acordo com a sua reatividade com a lenhina residual e podem ser distinguidos em três categorias, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação *Lachenal and Muguet* dos agentes de branqueamento
[19]

		Categorias		
		I	II	III
Reagentes de branqueamento	Com cloro	Cl_2	ClO_2	NaOCl
	Sem cloro	O_3	O_2	H_2O_2
Tipo de reação		Eletrofílica	Eletrofílica	Nucleofílica
Locais de atuação sobre a lenhina		Anel aromático	Grupos fenólicos livres e duplas ligações	Grupos carbonilos e ligações duplas
pH		Ácido	Ácido/alcalino	Alcalino

O ozono (O₃) e o cloro gasoso (Cl₂) são agentes que reagem como agentes eletrofilicos em anéis aromáticos de estruturas fenólicas. O dióxido de cloro (ClO₂) e o oxigénio (O₂) atacam principalmente grupos fenólicos livres. Os agentes nucleofílicos tais como o hipoclorito de sódio (NaOCl) e o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) atacam estruturas pobres em electrões, como as estruturas carbonílicas, com duplas ligações conjugadas. Comparativamente aos agentes eletrofilicos, os reagentes de branqueamento nucleofílicos, da categoria III, são menos eficientes no processo de deslenhificação, mas conferem brancura às pastas mais facilmente [19].

O branqueamento torna-se um processo mais eficiente quando a sequência utilizada contém um oxidante de cada categoria.

2.3.3. Biobranqueamento

A diminuição da produção de compostos prejudiciais para o ambiente (AOX) através dos branqueamentos livres de cloro elementar (ECF) e totalmente livres de cloro (TCF), foram um passo importante para a preservação do ambiente. Uma das alternativas para reforçar os branqueamentos mais convencionais é fazer biobranqueamento, que consiste em branquear as pastas recorrendo a processos que incluem tratamentos com agentes biológicos como as enzimas. Estas são substâncias de natureza proteica e, portanto, não poluentes, capazes de catalisar reações químicas. A sua função neste tipo de processo é deslenhificar e/ou modificar a lenhina residual das pastas, de forma a tornar mais fácil o branqueamento posterior. Um dos tipos de enzimas mais estudados para ser aplicada em biobranqueamento é o grupo das xilanases, no entanto, existem outras também possíveis de utilizar, nomeadamente lacases [22]. Grande parte dos estudos com este tipo de branqueamento é feito com enzimas oxidativas que atacam diretamente os resíduos de lenhina responsáveis pela cor castanha da pasta [23].

2.3.3.1. Xilanases

As xilanases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, e são produzidas em microrganismos e fungos [24]. São as principais enzimas utilizadas no biobranqueamento da pasta de papel e o seu uso nesta indústria tem aumentado ao longo

dos últimos anos [23]. As xilanases podem ser aplicadas em diferentes fases do branqueamento, mas, geralmente são introduzidas neste processo antes da aplicação do agente oxidante [25].

Existem diferentes tipos de xilanases, que atuam em diferentes posições da cadeia de xilanas, nomeadamente, endo-xilanases (EC. 3.2.1.8), β -xilosidase (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139) e esterases (EC 3.1.1.6). As endo-xilanases e a β -xilosidase são enzimas que catalisam a hidrólise da cadeia principal de xilanas; a α -glucuronidase e α -L-arabinofuranosidase provocam a remoção das cadeias laterais; as esterases hidrolisam as ligações éster entre xilanas e ácido acético ou fenólico [26]. Geralmente, o tipo de xilanases mais utilizada para o biobranqueamento são as endo-xilanases.

No biobranqueamento das pastas, as xilanases provocam a hidrólise das xilanas levando a que, durante o posterior processo químico de branqueamento, a lenhina esteja mais acessível e, por consequência, seja eliminada mais facilmente.

Existem diversos mecanismos descritos para a atuação das xilanases no processo de branqueamento [25]:

- (i) Clivagem enzimática de ligações glicosídicas entre xilana e lenhina, facilitando assim a remoção de lenhina: A lenhina que está ligada covalentemente à xilana pode ser extraída da fibra por despolimerização parcial da xilana, levando à libertação de fragmentos de lenhina residual.
- (ii) Hidrólise das xilanas precipitadas na superfície da fibra: durante o cozimento Kraft, ocorre a precipitação de pequenas cadeias de xilanas na superfície das fibras. As xilanases, que hidrolisam as xilanas, são capazes de hidrolisar estas pequenas cadeias de xilanas precipitadas, o que resulta numa redução da concentração de xilanas na parede secundária da superfície das fibras durante o tratamento enzimático com xilanases. Esta redução da concentração de xilanas aumenta a permeabilidade da superfície das fibras, aumentando a capacidade de branqueamento das pastas, uma vez que o acesso dos agentes branqueadores à lenhina residual é facilitado.
- (iii) Hidrólise de ligações glicosídicas perto de grupos HexA contendo xilopirranose ou estruturas cromóforas: as xilanases, ao hidrolisarem a

xilana, provocam a liberação de compostos ligados às xilanas, tais como estruturas aromáticas e cromóforas.

Em todos os mecanismos descritos, verifica-se que as xilanases apenas têm influência direta sobre as xilanas o que leva à liberação da lenhina. Desta forma a lenhina fica mais acessível para o branqueamento químico subsequente. Isto significa que as xilanases funcionam como auxiliares e não como agentes diretos do branqueamento, pois elas possibilitam o aumento de eficiência das etapas seguintes do processo.

2.3.3.2. Lacases

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas oxidativas e são encontradas em muitas plantas, fungos e microrganismos. Têm uma enorme aplicabilidade em biotecnologia e apresentam um peso molecular de 50-130 kDa, onde cerca de 45% deste peso corresponde a uma porção de hidratos de carbono que constituem a sua parte glicosídica [27].

A molécula de lacase, é uma glicoproteína dimérica ou tetramérica, contendo normalmente, quatro átomos de cobre (Cu) ligados a três locais de reação redox (tipo 1, tipo 2 e tipo 3). O tipo 1, no seu estado de repouso oxidado, é responsável pela cor azul da proteína e uma absorvância de aproximadamente 610 nm. O tipo 2 não exibe sinal no visível e funciona como aceitador de um eletrão. O tipo 3 consiste num par de átomos Cu numa conformação binuclear que dá uma fraca absorvância na região UV [28]. O funcionamento da lacase depende dos átomos de Cu distribuídos entre os três locais de ligação diferentes.

Esta enzima catalisa a oxidação de várias substâncias orgânicas, incluindo o-difenóis e p-difenóis, aminofenóis, polifenóis, poliaminas, metoxifenóis, lenhina, aril diaminas e alguns iões inorgânicos [29]. A sua utilização no biobranqueamento provoca oxidação de compostos fenólicos da lenhina, levando assim a uma maior facilidade da sua remoção no branqueamento [29]. Esta oxidação de compostos fenólicos ocorre por oxidação dos seus grupos hidroxilo fenólicos a radicais fenoxi enquanto o oxigénio, o aceitador final de eletrões, é reduzido a água (Figura 10).

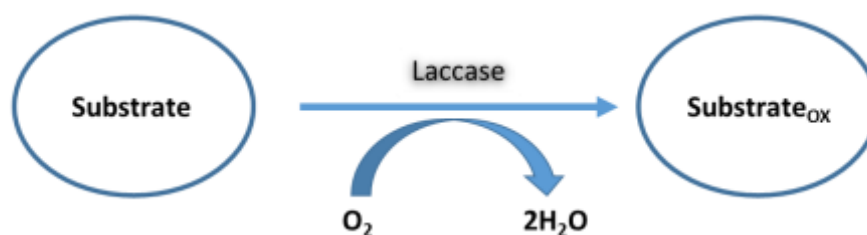


Figura 10 - Mecanismo geral da reação de oxidação da lacase
[30]

Esta atividade enzimática pode ser expandida através da utilização de compostos de baixo peso molecular com alto potencial redox, denominados mediadores como por exemplo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolone-6-sulfônico)) e HBT (1-hidroxibenzotriazol). Neste caso, o mecanismo oxidativo, envolve a capacidade da lacase oxidar o mediador em radicais livres, que reagem com qualquer substrato, que de outra forma não seriam substratos da lacase [30].

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

A pasta utilizada nos ensaios foi obtida por cozimento kraft de madeira de *Eucalyptus globulus*. Esta foi recolhida juntamente com um líquido denominado filtrado no Complexo Industrial de Cacia (The Navigator Company).

Na Figura 11 apresenta-se o diagrama do processo de branqueamento. A pasta formada durante o cozimento vem da Torre 0B, passa na prensa 2 e segue para o stand pipe de alimentação do D₀. O agente oxidante utilizado é o dióxido de cloro e, depois de adicionado ao processo, ocorre o primeiro estágio de branqueamento (D₀). Em seguida, a pasta sofre uma extração alcalina, E₁. Esta pasta passa novamente por uma prensa antes de serem realizados os últimos estágios de branqueamento (D₁ e D₂).

Os pontos de recolha de cada uma das amostras utilizadas neste trabalho estão assinalados na Figura 11. A Pasta 1 e a Pasta 2 foram recolhidas à saída do ‘stand pipe’ de alimentação do D₀ e a Pasta 3 e a Pasta 4 foram recolhidas à saída da prensa 2 da linha de lavagem de pasta à saída do digestor. As amostras de pasta recolhidas são similares, mas a Pasta 3 e a 4 sofreram menos lavagem do que a Pasta 1 e a 2.

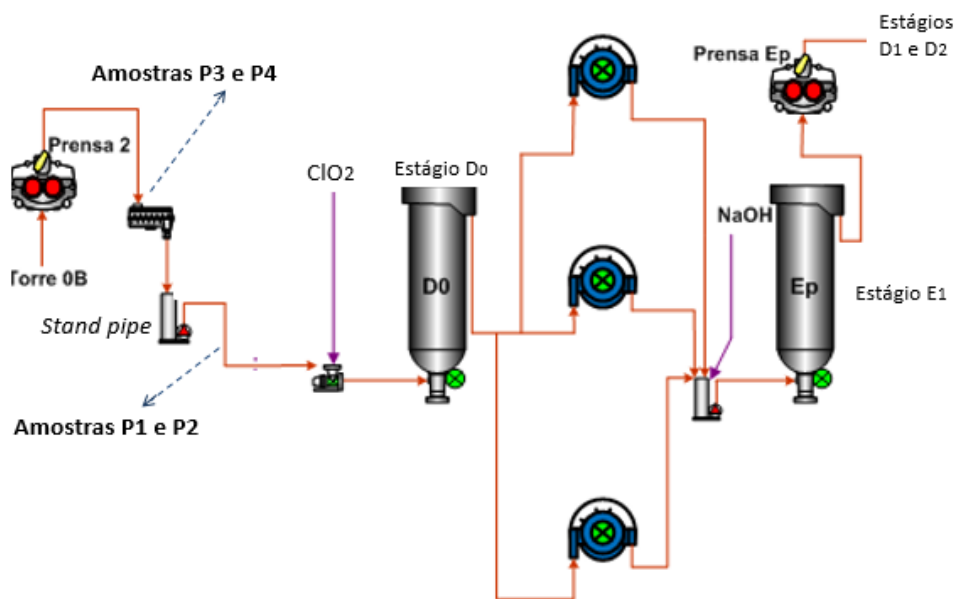


Figura 11 – Diagrama do processo da sequência de branqueamento D₀-E₁-D₁-D₂

Foram testados dois preparados enzimáticos - xilanases e lacase. As xilanases são hidrolases e, neste caso, foram utilizados dois preparados enzimáticos com atividade de xilanases: um produzido pela Novozymes e outro produzido pela Sertec20. No caso da lacase - uma enzima oxidativa - foi apenas utilizado um preparado enzimático produzido pela Novozymes.

Uma vez que não é possível o branqueamento total das pastas apenas com enzimas, foram ainda utilizados reagentes químicos no biobranqueamento, como dióxido de cloro, peróxido de hidrogénio e hidróxido de sódio.

3.2. Métodos

3.2.1. Atividade enzimática

3.2.1.1. Determinação da atividade enzimática de xilanases

As xilanases contidas no preparado enzimático hidrolisam o substrato composto modelo de xilana e obtêm-se monossacarídeos ou açúcares redutores simples. A determinação da concentração de açúcares redutores faz-se recorrendo a colorimetria ($\lambda=540$ nm) e ao ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) que é amarelo. A quantificação dos açúcares com poder redutor é feita com base na redução, em solução alcalina, do DNS. Os grupos carbonilo do açúcar são oxidados a carboxilos, obtendo-se ácidos aldónicos, enquanto que o DNS passa a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico que é vermelho-acastanhada. A atividade é expressa em unidade de termoxilanases por grama (TXU/g). A unidade de termoxilanase é definida como a quantidade de enzima que produz açúcares redutores que têm um poder redutor correspondente a 1 nmol de xilose de xilano num segundo (Teste realizado pela empresa fornecedora do preparado enzimático – Sertec20).

3.2.1.2. Determinação da atividade enzimática da lacase

A lacase é uma enzima oxidativa e a sua atividade pode ser determinada por oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS) que muda de cor ao sofrer oxidação. A medição da atividade desta enzima foi feita pelo método

colorimétrico de *Ander e Messner* [31] usando um espectrofotômetro UV-vis (UV mini-1240, Shimadzu Co). Foram necessárias duas soluções: solução tampão citrato fosfato, para manter o pH constante e solução de ABTS. A solução tampão, num volume total de 250 mL, foi preparada por junção de duas soluções diluídas: solução aquosa de 3,75 g de citrato monohidratado e solução aquosa de 7,45 g de fosfato de sódio. No final confirmou-se o valor de pH pois deve ter o valor de 4,5. No caso da solução de ABTS, foi preparada por dissolução de ABTS em água destilada, com concentração final de 1,100 g/L.

O teste de atividade foi feito usando um espectrofotômetro onde se colocou, numa célula, 1,400 mL de solução tampão, 0,500 mL de solução de ABTS e 0,100 mL da solução de enzima a testar, previamente termostatizados a 40°C. A absorvância foi lida no comprimento de onda de 420 nm e o valor que se obteve foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática, através da equação seguinte:

$$\frac{IU}{g} = \frac{Abs * 60 * f_d * 10^6}{36000 * 10^3} \quad (1)$$

Onde,

f_d : fator de diluição da enzima

Abs: valor da absorvância por minuto medido pelo espectrofotômetro.

60: fator de conversão de segundo para minuto

10^6 : fator de conversão de mol para μmol

36000: Coeficiente de extinção molar, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

As unidades da atividade enzimática da lacase são dadas em IU/g e indicam a quantidade de enzima existente que oxida 1 μmol de substrato (ABTS) por minuto por grama de enzima.

3.3. Tratamento das pastas cruas

Antes de se fazer o biobranqueamento das pastas utilizadas, foram feitos testes para as caracterizar, nomeadamente a determinação do teor de secura, a medição do índice kappa e a leitura da refletância.

3.3.1. Determinação do teor de secura

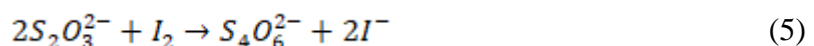
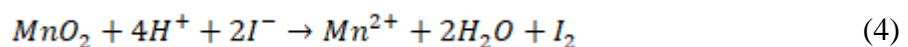
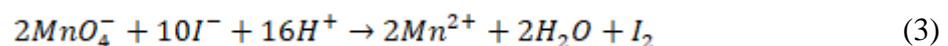
O teor de secura é um valor que indica a quantidade de pasta seca que existe na amostra utilizada. Para se obter um valor mais correto, para cada amostra determinou-se o teor de secura em duplicado, ou seja, para cada ensaio, pesaram-se duas amostras de pasta. Estas amostras foram colocadas na estufa, a aproximadamente 105 °C, onde permaneceram até ao dia seguinte. Nessa altura, pesou-se e determinou-se a quantidade de pasta seca. O teor de secura foi depois determinado pela equação 2:

$$\text{Teor de secura, \%} = \frac{\text{massa de pasta seca}}{\text{massa de pasta húmida}} * 100 \quad (2)$$

3.3.2. Determinação do Índice kappa

O índice kappa é uma medida que determina o teor de lenhina residual na pasta. Corresponde ao volume de oxidante forte, nomeadamente permanganato de potássio 0,100 N (KMnO₄), consumido por grama de pasta seca.

Para este teste, pesou-se a pasta a analisar e colocou-se num copo com cerca de 800 mL de água, que se pôs em agitação dentro de um banho, a aproximadamente 25°C. A esta suspensão adicionou-se 100 mL de ácido sulfúrico 2,00 mol/L e 100 mL de permanganato de potássio 0,020 mol/L. A reação de oxidação do permanganato em meio ácido ocorreu durante 10 minutos com agitação e a 25°C, no final dos quais, se adicionaram 20,0 mL de iodeto de potássio 1,0 mol/L para parar a reação. O passo seguinte foi a titulação desta suspensão com tiosulfato de sódio 0,200 mol/L, usando como indicador o cozimento de amido. Este indicador em contacto com o dióxido de cloro, confere à solução a cor azul escura típica da reação do amido com o iodeto. As reações que ocorreram durante a titulação foram as seguintes:



No fim da titulação, registou-se o valor de volume gasto, que foi utilizado para o cálculo do índice-kappa, através da equação 6.

$$IK = \frac{(V_{\text{titulado branco}} - V_{\text{titulado ensaio}}) * 1,983 * f}{E} \quad (6)$$

O volume de titulado gasto no ensaio em branco foi determinado através do mesmo teste, mas sem utilizar pasta, de modo a obter um valor de referência. O f é um valor tabelado (Tabela 5) e corresponde ao fator de correção e o E é massa de pasta seca.

Tabela 5 - Valores tabelados do fator de correção, f

P	+0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0,958	0,960	0,962	0,964	0,966	0,968	0,970	0,973	0,975	0,977
40	0,979	0,981	0,983	0,985	0,987	0,989	0,991	0,994	0,996	0,998
50	1,000	1,002	1,004	1,006	1,009	1,011	1,013	1,015	1,017	1,019
60	1,022	1,024	1,026	1,028	1,030	1,033	1,035	1,037	1,039	1,042
70	1,044									

3.3.3. Refletância / Brancura

A refletância é uma medida que indica a brancura de determinada pasta através da incidência de um feixe de luz azul visível com comprimento de onda de 457 nm, sobre pequenas amostras de folhas de papel formadas com a referida pasta (Figura 12). O método mais utilizado nesta determinação é o método padrão ISO 2470-1 2016. Este método dá a percentagem de brancura de uma pasta, sendo a brancura ISO de um material preto e não refletor de 0%, enquanto que o de um material difusor perfeito é de 100%. O branqueamento é um processo químico que ajuda a remover a cor escura das pastas, por remoção da lenhina. Este provoca também um aumento da quantidade de luz refletida pela folha de pasta, uma vez que a concentração de cromóforos que absorvem essa luz é reduzida durante o branqueamento[19].

3.3.3.1. Formação das folhas de pasta

Para se poder ler a refletância da pasta tratada, procedeu-se à formação de folhas de pastas: inicialmente colocaram-se 8 gramas de pasta seca em 2 L de água ultrapura num recipiente. A mistura foi agitada até que toda a pasta estivesse completamente misturada na água. Nessa altura foi acertado o pH da suspensão para um valor compreendido entre 4,7 e 5. A mistura anterior foi dividida em quatro partes iguais de forma a que se formassem quatro folhas (Figura 12). A formação da folha consistiu na filtração da suspensão fibrosa usando um funil de *buchner* e papel de filtro húmido. As 4 folhas formadas foram prensadas e colocadas a secar à temperatura ambiente durante cerca de 2h30.



Figura 12 - Amostras de folhas formadas com a pasta branqueada

3.3.3.2. Leitura da refletância / Brancura

Depois de bem secas, as folhas foram novamente prensadas e, finalmente, foi lida a refletância, utilizando para o efeito um espectrofotómetro próprio para indústria papelreira, o *Elrepho 3000* da empresa *Lorentzen & wettre*. Tal como referido anteriormente, esta leitura foi feita através da incidência de um feixe de luz com comprimento de onda de 457

sobre as folhas e foi lida em diferentes pontos de cada uma das quatro folhas, num total de 10 leituras.

3.4. Biobranqueamento

O branqueamento é o processo através do qual as pastas resultantes do cozimento adquirem brancura, por remoção da lenhina residual e dos grupos cromóforos presentes, habitualmente conseguido através de uma sequência de diferentes estágios industriais (D_0 - E_1 - D_1 - E_2 - D_2). Neste trabalho, uma vez que o objetivo era verificar se a utilização de enzimas se refletia em branqueamento das pastas, foi apenas feito um “pré-branqueamento”, ou seja, não foi feita a sequência completa, mas apenas os dois primeiros estágios realizados industrialmente (D_0 e E_1). Com vista a uma menor utilização de oxidante dióxido de cloro, antes destes dois estágios, foram aplicadas as enzimas e, assim, a sequência de biobranqueamento utilizada foi X- D_0 - E_1 .

Todos os estágios foram realizados introduzindo a pasta a tratar em sacos de polietileno e ainda o filtrado ou o meio de tratamento para promover um bom contacto. Os sacos foram depois bem atados, e colocados num banho, utilizando, para cada estágio, as condições apresentadas na Tabela 6:

Tabela 6 - Condições dos ensaios para cada uma das etapas realizadas

Condições	NaOH	X	D_0	E_1
%(m/m pasta seca)	1,0 de NaOH	Lacase: 0,010 - 0,075 Xilanase: 0,007 - 0,010	3,0 de ClO_2	2,1 de NaOH e 1 de H_2O_2
Tempo, min	60	45	25	120
Temperatura, °C	70	60	60	70
Consistência, %	10			
pH inicial	--	4,5	--	--

3.4.1. Extração com hidróxido de sódio

Em algumas pastas foi realizada uma extração com hidróxido de sódio, 1% (m/m de pasta seca), para que fossem eliminados aditivos presentes na pasta, que viessem a impedir a atuação enzimática. De facto, usaram-se algumas pastas que continham um agente antimicrobiano que tem na sua constituição o anel de isotiazolinona, que impede as enzimas de atuarem.

Nesta etapa, foi aplicado hidróxido de sódio e adicionada água de forma a que o volume final (amostra de pasta, água e hidróxido de sódio) fosse de 500 mL. A mistura foi depois colocada no banho a 70°C durante 1 hora. Findo este tempo fez-se lavagem da pasta com água (750 mL) correspondente à quantidade de 15 vezes a pasta seca utilizada que, no caso de cada ensaio, era de 50g.

3.4.2. Estágio X – aplicação de enzimas

Este tratamento consistiu em promover o contacto das enzimas com a pasta que se pretendia branquear. As enzimas utilizadas foram os preparados de xilanases e o preparado de lacase comerciais. Foram feitos ensaios com cada uma das enzimas em separado e com as duas enzimas em simultâneo. As enzimas foram previamente diluídas segundo um fator de diluição de 1/500 e as quantidades utilizadas foram calculadas de acordo com o anexo A. Foram adicionadas ao filtrado, de forma a que a distribuição posterior na pasta fosse uniforme. Esta mistura foi depois adicionada ao saco que continha uma quantidade de pasta húmida equivalente a 50 g secas. Depois de misturar bem o filtrado com a pasta, de forma a garantir uma boa distribuição, colocou-se num banho a 60 °C durante 45 minutos. No fim desse tempo fez-se filtração e recolheu-se o filtrado, tendo a pasta sido posteriormente lavada com 750 mL de água (15x50g secas).

3.4.3. Estágio D₀: de Aplicação de dióxido de cloro

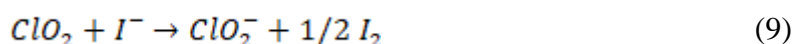
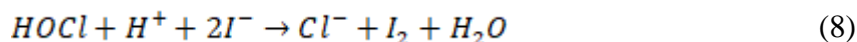
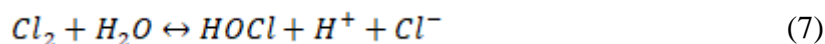
Neste estágio, D₀, aplicou-se dióxido de cloro, ClO₂, 3% (m/m de pasta seca) à pasta para oxidar a lenhina, fazendo assim com que a pasta adquirisse brancura. O ClO₂ foi adicionado ao filtrado recolhido no estágio anterior, de forma a que o agente branqueador

ficasse bem distribuído no filtrado para que, aquando da sua junção ao saco que continha a pasta, houvesse uma distribuição uniforme do dióxido de cloro por toda a amostra de pasta a branquear. Ao saco com a pasta foi ainda adicionada água, cujo volume necessário foi determinado como demonstrado no Anexo A.

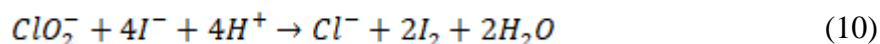
O saco que continha esta mistura foi novamente colocado no banho à mesma temperatura (60°C) durante 25 minutos. No fim deste estágio, fez-se filtração e lavagem da pasta tal como descrito nos estágios anteriores. Neste caso, o filtrado foi recolhido para posterior análise do cloro residual.

3.4.3.1. Determinação da concentração do dióxido de cloro

Como a concentração do dióxido de cloro não é constante, isto é, vai diminuindo ao longo do tempo, uma vez que este é um composto muito volátil, antes de cada ensaio foi necessário fazer a sua quantificação. Esta análise quantitativa foi feita por titulação do dióxido de cloro com tiosulfato de sódio 0,0500 M. Começou por se juntar 25,0 mL de iodeto de potássio a 10% com 50 mL de água. Ajustou-se o pH a 8,3 e juntou-se 5,00 mL de dióxido de cloro. As reações que ocorreram nesta fase foram as seguintes:



O indicador utilizado nesta titulação foi o cozimento de amido. O volume gasto na titulação foi anotado e denominado de T1. Diminuiu-se o pH até se obter um valor inferior a 2, usando ácido clorídrico para o efeito, ocorrendo a seguinte reação:



Fez-se nova titulação com tiosulfato de sódio e registou-se o novo valor de titulante gasto (T2). No fim, a relação entre os dois volumes gastos (T1 e T2) era $4T_1 > T_2$ e as equações utilizadas para a determinação da concentração de ClO_2 foram as seguintes:

$$Cl_2(g/L) = \frac{71 * M * \left(T_1 - \frac{T_2}{4}\right)}{2 * a} \quad (11)$$

$$ClO_2(g/L) = \frac{67,5 * 2,63 * M * T_2}{4 * a} \quad (12)$$

Onde **M** corresponde à molaridade da solução de tiosulfato e **a** corresponde ao volume da amostra de dióxido de cloro em mL.

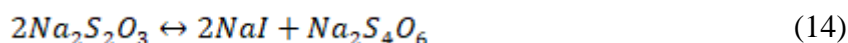
3.4.3.2. Cloro residual

Depois do estágio de aplicação de dióxido de cloro, o filtrado foi recolhido e fez-se um teste para determinar a quantidade de ClO₂ residual. Esta determinação foi feita por titulação com tiosulfato de sódio 0,0500 M, onde o titulando era formado por 100,0 mL de filtrado, 15,0 mL de iodeto de potássio e 25,0 mL de ácido acético usando solução cozimento de amido como indicador. Tal como referido, a reação do amido com iodeto confere cor azul escura à solução. Assim, se aquando da junção de cozimento de amido, a solução não mudasse de cor, de amarelo para azul escuro, significava que todo o ClO₂ utilizado tinha sido consumido. Caso contrário, significava que alguma quantidade deste composto não tinha reagido.

Nesta situação ocorre a reação do cloro com o iodeto de potássio segundo a equação (13):



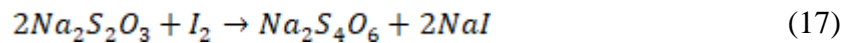
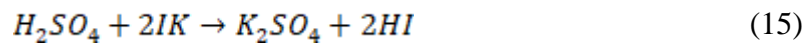
A decomposição do tiosulfato de sódio é descrita pela equação (14):



3.4.4. Estágio E₁ - Extração alcalina

O último estágio do branqueamento foi a extração alcalina reforçada com peróxido de hidrogénio. Esta extração teve por objetivo remover os grupos cromóforos que se encontravam na pasta, permitindo assim que a pasta ficasse com maior brancura.

Os reagentes utilizados foram de hidróxido de sódio 40 g/L e peróxido de hidrogénio, 2,1% (m/m de pasta seca) e 1% (m/m se pasta seca), respetivamente. Estes reagentes foram adicionados à pasta juntamente com água, cuja quantidade foi calculada de forma a que o volume final da mistura fosse 500 mL, como se exemplifica no anexo A. A reação ocorreu durante 2 horas à temperatura de 70°C. Findo este tempo, filtrou-se a pasta, fez-se lavagem com água, como descrito, e pesou-se a pasta final. Durante este processo as reações que ocorreram foram:



3.4.4.1. Determinação da concentração de peróxido de hidrogénio

Aquando da sua primeira utilização, era necessário determinar a concentração de peróxido de hidrogénio ativo para se determinar o volume necessário. Esta determinação era feita por titulação, onde como titulado se tinha a mistura de 10,0 mL de peróxido de hidrogénio, 40,0 mL de ácido sulfúrico 1,00 N e 15,0 mL de iodeto de potássio 1,00 N. A esta solução adicionou-se 3 a 4 gotas de molibdato de amónio a 2%, que funcionava como catalisador da reação. A titulação foi feita com tiosulfato de sódio 0,05N e com cozimento de amido como indicador. A concentração de peróxido determinou-se pela equação (18):

$$H_2O_2 (g/L) = \frac{0,17}{2} * V_{gasto} \quad (18)$$

Seguidamente é apresentada a Tabela 7 com um resumo de todos os ensaios realizados.

Tabela 7 - Tabela-resumo de todas as sequências de ensaios realizados para cada uma das enzimas

Amostra de pasta	Lavagem com NaOH	Estágio X	D ₀ -E ₁
1	X	Xilanases	✓
1	X	Lacase	✓
2	X		✓
3	✓		✓
4	✓		✓
1	X	Xilanases + Lacase	✓
4	✓		✓

X – não se realizou ✓ – realizou-se

3.5. Análise das pastas branqueadas

Os testes analíticos feitos às pastas depois de branqueadas, foram o índice micro-kappa e a refletância. No caso da refletância, o ensaio foi feito da mesma forma que está descrito na secção 3.3.3.

3.5.1. Índice micro-kappa

O índice micro-kappa é definido como a medida de deslenhificação de uma pasta com fraco teor de lenhina.

Este teste é muito similar ao descrito anteriormente na secção 3.3.2 (determinação do índice kappa). No entanto, como neste caso o ensaio é feito em pastas branqueadas, a quantidade de lenhina presente é menor e, portanto, as quantidades de reagente também

são inferiores: 20 mL de permanganato de potássio 0,100 M e 20 mL de ácido sulfúrico 4N.

A pasta foi previamente pesada e dispersa num copo com 150 mL de água. Os reagentes foram adicionados ao referido copo que se encontrava no banho a 25°C. Deixou-se durante 10 minutos e no final adicionou-se 10 mL de iodeto de potássio para parar a reação. Fez-se titulação com tiosulfato de sódio 0,050 M, na presença de cozimento de amido. Fez-se o ensaio em branco, que corresponde ao mesmo ensaio, mas sem utilizar pasta. Finalmente calculou-se o índice micro-kappa, utilizando a seguinte sequência de cálculos:

$$C = \frac{(V_{branco} - V_{ensaio}) * M}{0,01} \quad (19)$$

$$P = C * 10 \quad (20)$$

Onde, C corresponde ao consumo de permanganato de potássio e P é utilizado apenas para determinar o fator de correção f, que é um valor tabelado (Tabela 6), e é necessário para a equação 21, onde se determina o valor do índice micro-kappa (IMK).

$$IMK = \frac{C * f}{E} \quad (21)$$

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

Neste trabalho fez-se o estudo do branqueamento de várias amostras de pasta de papel de *Eucalyptus globulus*, recolhida na fábrica de Cacia da *The Navigator Company*. Aplicaram-se enzimas (xilanases e lacase) para o efeito, de forma a tornar o processo de branqueamento menos agressivo para o ambiente, uma vez que a sua utilização proporciona a redução da quantidade do agente branqueador, dióxido de cloro, necessária.

4.1. Atividade enzimática

Este trabalho foi realizado recorrendo à aplicação de enzimas para efetuar o biobranqueamento de pastas. A função das enzimas é catalisar a transformação de substratos em produtos por meio de reações bastante seletivas, pois as enzimas só catalisam determinados substratos, segundo o modelo da chave-fechadura.

4.1.1. Atividade inicial das Xilanases

De acordo com a empresa fornecedora do preparado enzimático Serzym 90 (Sertec20) este preparado enzimático tinha uma atividade de 760 000 TXU/g pasta, determinado pelo método descrito na secção 3.2.1.1.

4.1.2. Atividade inicial da Lacase

A bioatividade da lacase foi determinada pelo método de *Ander e Messner 1998*, tal como descrito anteriormente, na secção 3.2.1.2.. A lacase utilizada foi da Novozymes: NZ-51003, e foram utilizadas duas amostras desta. Neste caso, a atividade enzimática foi medida em IU/g e os resultados de obtidos para cada uma das amostras de lacase são os apresentados na Tabela 8:

Tabela 8 - Valores de atividade enzimática do preparado enzimático de lacase NZ-51003

	Atividade enzimática, IU/g
NZ-51003, A	1210
NZ-51003, B	5516

Nesta Tabela verifica-se que a atividade enzimática da segunda amostra de lacase é superior à atividade registada com a primeira, o que significa que a segunda amostra estava mais ativa.

4.2. Biobranqueamento

O objetivo principal foi estudar a possibilidade da ação conjunta das enzimas, xilanases e lacase, no processo de biobranqueamento de pasta de papel. Para tal, foram utilizadas algumas amostras de pasta, todas elas recolhidas no Complexo Industrial de Cacia. Inicialmente, as duas primeiras amostras de pasta (Pasta 1 e Pasta 2), foram recolhidas à saída do *stand pipe* de alimentação do D₀, no entanto, com a segunda amostra, registaram-se alguns problemas inesperados, relacionados com a atividade enzimática, isto é, não se verificou qualquer atuação por parte das enzimas. Tendo em conta que, com a Pasta 1, as enzimas tinham reagido bem, o problema estaria relacionado com a pasta utilizada. Com base noutros trabalhos em curso no RAIZ, soube-se que, devido ao tratamento das pastas, a nível industrial com aditivos, houve adição de um biocida que certamente foi o responsável pela não atuação das enzimas. Tratava-se de um composto com ligações N-S. Estas ligações são encontradas em substâncias que contêm o anel tiazolinona e em compostos N-haloalquiltio. O anel isotiazolinona reage com as enzimas e inativa-as com a abertura simultânea do seu anel, exercendo assim inibição da atividade enzimática. O mecanismo desta reação pode ser analisado na Figura 13 onde Nul representa as entidades nucleofílicas da célula microbiana, duma proteína ou mesmo dum aminoácido [32].

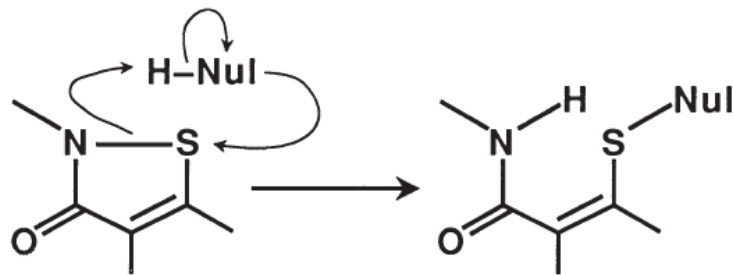


Figura 13 - Mecanismo de atividade da estrutura de isotiazolinona [19]

Desta forma, qualquer composto aminoácido, proteína ou enzima é degradado e impedido de atuar. A presença deste composto levou a que não houvesse resultados com a Pasta 2 e, por esta razão, fizeram-se novas recolhas noutra fase do processo, onde a concentração de aditivos era muito inferior à verificada no *stand pipe*. O novo ponto de recolha foi à saída da terceira prensa da linha de lavagem da pasta, à saída do digestor.

Recolhida a nova amostra de pasta, verificou-se o mesmo problema, pelo que se recorreu a um tratamento da pasta com hidróxido de sódio, de forma a eliminar todos os biocidas que ainda estavam presentes. Só depois deste tratamento foram feitos os estágios X (aplicação de enzimas), D₀ (aplicação de dióxido de cloro) e E₁ (extração com peróxido de hidrogénio).

Seguidamente são apresentados os resultados de brancura e de índice kappa/micro-kappa em função da carga de enzima e de oxidante clorado, obtidos com a aplicação das enzimas no processo de bi branqueamento das pastas.

4.2.1. Xilanases

No caso das xilanases, Serzym 90 e NS-5112, os principais ensaios foram feitos com a pasta 1 numa sequência X-D₀-E₁. Utilizou-se uma pasta crua para comparação, fez-se um branco sem adição de enzimas e testou-se a adição de cada um dos preparados de xilanases em duas doses diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados obtidos no bibranqueamento da Pasta 1 como preparados enzimáticos de xilanases Serzym 90 e NS-51121

	X-D ₀ -E ₁				Resultados		
	Dose de enzima (g/t)	ClO ₂ (%)	Cloro ativo total		IK/ Micro-kappa	Refletância	
			(%)	Redução (%)		(%)	Desvio do branco (%)
Pasta crua	0	0	5,09	--	21	34,5	--
Branco	0	3,00	5,09	--	2,6	77,1	--
Serzym 90	70	3,00	5,09	0	2,7	78,5	+1,4
	100	2,55	4,64	15	3,2	76,2	-0,9
NS-51121	70	3,00	5,09	0	2,4	79,8	+2,7
	100	2,55	4,64	15	3,1	77,5	+0,4

Os resultados do ensaio em branco resultam do branqueamento D₀-E₁ de uma pasta crua pelo que, como esperado, verifica-se que há um grande aumento a nível de refletância. Regra geral, utilizou-se uma percentagem de dióxido de cloro de cerca de 3% do peso seco de pasta e de 1% de peróxido de hidrogénio do peso seco de pasta. Os primeiros ensaios de aplicação de enzimas (estágio X) foram feitos com 70 g/t.o.d (gramas de enzima por tonelada de pasta seca) de xilanases e verificou-se que a refletância aumentou com ambos preparados de xilanases utilizados. Sendo o objetivo a redução da quantidade de dióxido de cloro, seguidamente aumentou-se a carga de enzima para 100 g/t.o.d. e, reduziu-se ainda a quantidade de dióxido de cloro para 2,55 %. Provou-se que esta enzima permite a redução de ClO₂, pois a refletância obtida foi próxima da registada no ensaio em branco, tal como se pode verificar no gráfico da Figura 14. Embora os resultados com os dois preparados enzimáticos sejam similares, nota-se uma ligeira diferença entre os dois, sendo o da Novozymes o que apresenta melhores resultados. Por esta razão, os restantes ensaios com xilanases foram feitos com este preparado enzimático.

Analisando os valores do índice micro-kappa, verifica-se que, geralmente, diminuíram com o aumento da refletância, o que era expectável, pois este mede o nível de deslenhificação das pastas: quanto mais branca a pasta, maior será esse grau já que existe menos lenhina. Quanto ao índice kappa da pasta crua, esperava-se que este se encontrasse à volta de 13-15, mas o valor registado foi 21, o que é muito diferente. Isto ocorreu porque os valores de índice kappa esperados são válidos para a pasta depois de lavada. Neste caso,

a amostra de pasta não sofreu qualquer tipo de lavagem e, portanto, o índice kappa registado foi superior.

Os resultados apresentados na Tabela 9 permitem concluir que a utilização de xilanases se torna vantajosa no processo de biobranqueamento, pois permitiu reduzir a quantidade de dióxido de cloro em 15%.

A diferença entre os branqueamentos das pastas com e sem xilanases, é perceptível no gráfico da Figura 14, que a seguir se apresenta.

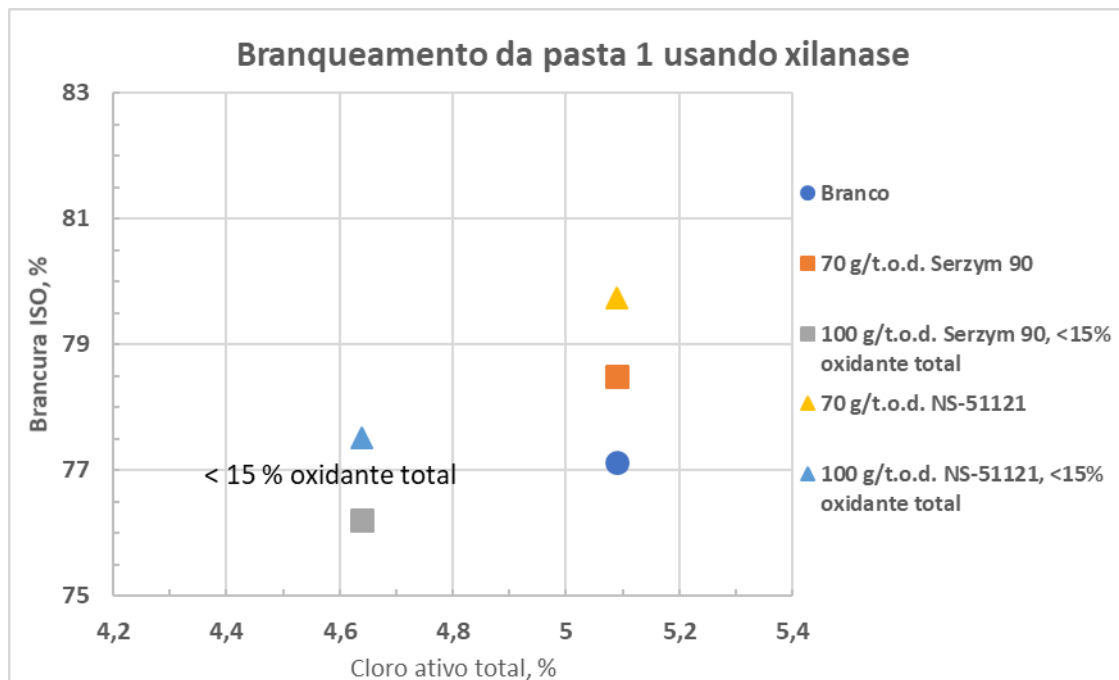


Figura 14 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total, no branqueamento da Pasta 1, com dois preparados enzimáticos de xilanases (Serzym90 e NS-51121)

Na Figura 14, é possível verificar claramente que com o preparado enzimático Serzym90 a brancura é inferior à obtida com o preparado enzimático NS-51121 nas mesmas condições. Verifica-se ainda que com 100 g/t.o.d. de xilanases do preparado NS-51121 há redução de 15% de oxidante total e a brancura obtida (77,5%) está ao nível da refletância do ensaio em branco (77,1%), enquanto que com o Serzym 90, o valor de brancura atingido fica um pouco abaixo (76,2%).

4.2.2. Lacase

Seguidamente fizeram-se ensaios com a outra enzima testada neste trabalho, a lacase. Neste caso, a enzima foi testada em diferentes amostras de pasta estando os resultados obtidos apresentados abaixo.

4.2.2.1. Pasta 1

No caso da pasta 1, tal como sucedeu com as xilanases, conseguiu-se obter bons resultados, como se mostra na Tabela 10 e na Figura 16, tendo-se conseguido o objetivo que era a redução de dióxido de cloro.

Tabela 10 - Resultados obtidos no bibranqueamento da Pasta 1 com preparado enzimático de lacase NZ-51003

	X-D ₀ -E ₁				Resultados		
	Dose de enzima (g/t)	ClO ₂ (%)	Cloro ativo total		IK/ Micro-kappa	Refletância	
			(%)	Redução (%)		(%)	Desvio do branco (%)
Branco	0	3,00	5,09	--	2,6	77,1	--
NZ-51003	100	3,00	5,09	0	2,9	76,8	-0,3
	200	3,00	5,09	0	3,0	76,3	-0,8
	500	3,00	5,09	0	2,6	79,8	+2,7
	500	2,25	4,34	25	2,8	74,2	-2,9

Os resultados mostram que apenas a utilização de 500 g/t.o.d. foi vantajosa para o processo porque, com 100 g/t.o.d e 200 g/t.o.d., as refletâncias obtidas foram inferiores ao que se tinha verificado com o ensaio em branco, ou seja, estas quantidades ainda eram insuficientes para que se pudessem registar melhorias no processo. Sendo o objetivo a redução de dióxido de cloro, devido aos seus impactes no ambiente, tentou-se então reduzir a quantidade de ClO₂ no ensaio com esta enzima. Experimentou-se uma redução de 25%, o que se verificou ser demasiado, pois a refletância baixou 2,9%, comparativamente ao ensaio em branco. Por tratamento dos resultados registados na Tabela 10, com 500 g/t de enzima, obteve-se a reta definida pelos pontos de refletância em função da quantidade de dióxido de cloro utilizado (Figura 15), correspondente à equação 22:

$$\text{Brancura ISO} = 7,467 * \% \text{ClO}_2 + 57,4 \quad (22)$$

4. Resultados e Discussão

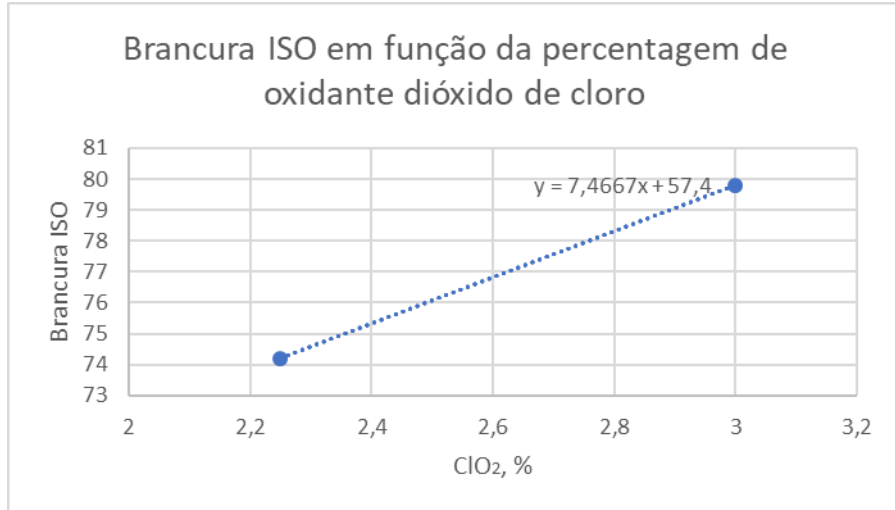


Figura 15 - Gráfico da brancura obtida em função da porcentagem de ClO₂ utilizado

Através da reta da Figura 15, verifica-se que para o valor de brancura do ensaio em branco (77,1), a porcentagem de dióxido de cloro necessária é 2,63, que corresponde a uma porcentagem de redução de ClO₂ de aproximadamente 10%.

Na representação gráfica a seguir apresentada (Figura 16), encontram-se os valores de refletância obtidos para os diferentes ensaios realizados.

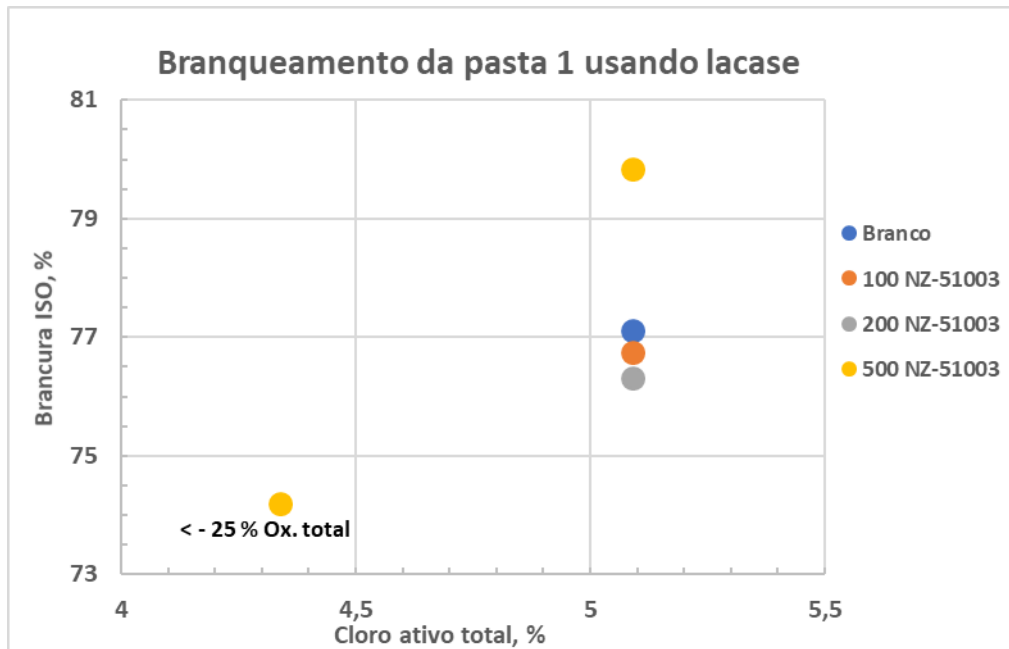


Figura 16 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento da Pasta 1 com o preparado enzimático de lacase NZ-51003

A Figura 16 ilustra o que foi referido acima relativamente à quantidade de enzima necessária, pois o valor de brancura com mais destaque é o que se obteve com 500 g/t.o.d. de lacase (79,8%), uma vez que todos os outros se encontram bastante próximos da brancura obtida com o ensaio sem enzima (branco, com 77,1%). Outro ponto de destaque é o valor registado com a redução de 25% de ClO₂, de 74,2%, pois encontra-se abaixo do valor de referência, comprovando que essa redução foi exagerada.

4.2.2.2. Filtrado

A lacase foi também utilizada com a Pasta 2 e verificou-se que não estava a atuar. Tal como já referido anteriormente, a causa deste problema foi a existência de aditivos na amostra de pasta. Para verificar se também o filtrado exercia um efeito negativo no branqueamento com lacase, testou-se a atividade desta, segundo o teste de *Ander e Mensser 1998* descrito na secção 3.2.1.2. com filtrado P2, com água e fez-se também o mesmo ensaio com o líquido de espremedura da pasta normal e com o líquido de espremedura depois da pasta bem lavada com água. Na Tabela 11 podem ver-se os valores que se obtiveram para os diferentes testes de atividade enzimática da lacase. Estes testes foram realizados com o preparado enzimático B que, de acordo com a Tabela 8, é o que se encontra mais ativo.

Tabela 11 - Resultados de atividade enzimática da lacase (com e sem solução tampão) na presença de filtrado e de água com acerto de pH

	Atividade, IU/g	
	Sem tampão	Com tampão
Preparado enzimático da Novozymes: NZ-51003, B	5516	
Ensaio com H₂O (dest.), pH 4,5	111	2838
'Filtrado'¹ pasta lavada com água destilada, pH 4,5	61	2206
'Filtrado'¹ pasta sem lavagem, pH 4,5	44	297
Filtrado P2, pH 4,5	8	18

¹ - Líquido de espremedura da pasta – líquido recolhido por filtração da pasta

Uma das principais conclusões que se tira desta tabela é que a solução tampão tem uma influência muito positiva sobre a enzima, pois neste caso, registaram-se valores significativamente superiores, comparativamente aos registados sem tampão, e, portanto, a utilização desta solução no processo de branqueamento pode levar a uma melhoria dos resultados.

Outro aspeto importante a retirar desta tabela é que a existência conjunta de filtrado P2 e enzima, leva à sua inibição quase completa, pois os valores de atividade baixaram praticamente para zero nessa situação. Isto leva a concluir que os aditivos que inibem a atividade enzimática também se encontram no filtrado e, portanto, tornam o processo de branqueamento com enzimas menos eficiente. Por esta razão, a forma mais eficaz para prosseguir os ensaios foi utilizar água com acerto de pH em vez do filtrado da pasta.

Os ensaios com o líquido de espremedura da pasta normal e com o líquido de espremedura, depois da pasta bem lavada permitiram concluir que após a lavagem intensiva da pasta, alguns aditivos são removidos, pois a atividade enzimática é superior à registada com o líquido de espremedura recolhido da pasta, sem lavagem. Ainda assim, essa remoção não é suficiente para que seja viável a utilização de enzimas, pois comparativamente ao ensaio com água com acerto de pH, este ensaio resulta num valor inferior de atividade enzimática.

Desta forma, os ensaios que se seguiram foram sempre feitos com água em vez de filtrado, nomeadamente com as pastas 3 e 4, cujos valores se apresentam a seguir.

4.2.2.3. Pasta 3

A Pasta 3 foi a primeira pasta à qual foi feita extração com hidróxido de sódio. Recorreu-se a este procedimento para remover aditivos, uma vez que não estava a haver reação por parte das enzimas, como mostra a Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 3 sem extração com hidróxido de sódio

	X-D ₀ -E ₁				Resultados		
	Dose (g/t)	ClO ₂ (%)	H ₂ O ₂ (%)	Cloro ativo total (%)	Micro-kappa	Refletância	
						%	Desvio do branco (%)
Branco	0	3,00	1,00	5,09	3,3	74,8	--
NZ-51003	100	3,00	1,00	5,09	3,6	71,4	-3,4
	750	3,00	1,00	5,09	3,5	74,2	-0,6

Nesta Tabela 12 estão apresentados os resultados que se obtiveram com a Pasta 3 original, ou seja, sem tratamento com hidróxido de sódio. O que se verifica é que, mesmo com grandes quantidades de enzima, a brancura não aumenta, apenas se aproxima do valor de referência. Por este motivo, testaram-se os mesmos ensaios na pasta depois de esta ter sido sujeita ao tratamento com hidróxido de sódio e, o que se verificou foi que neste caso já houve reação por parte da enzima como se pode ver pelas Tabela 13 e Figura 17.

Tabela 13 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 3 após extração com hidróxido de sódio

	X-D ₀ -E ₁				Resultados		
	Dose (g/t)	ClO ₂ (%)	H ₂ O ₂ (%)	Cloro ativo total (%)	Micro-kappa	Refletância	
						%	Desvio do branco (%)
Branco	0	3,00	1,00	5,09	3,1	78,0	--
NZ-51003	500	3,00	1,00	5,09	2,6	81,5	+3,5
	750	3,00	1,00	5,09	2,4	81,2	+3,2

Como se verifica nestes resultados, depois da extração com NaOH, já houve um aumento de brancura, comparativamente ao ensaio em branco, e, portanto, conclui-se que a extração com hidróxido de sódio elimina os aditivos presentes, tornando possível a atuação das enzimas. Desta forma, este foi um passo essencial para que se conseguissem resultados positivos no processo de biobranqueamento.

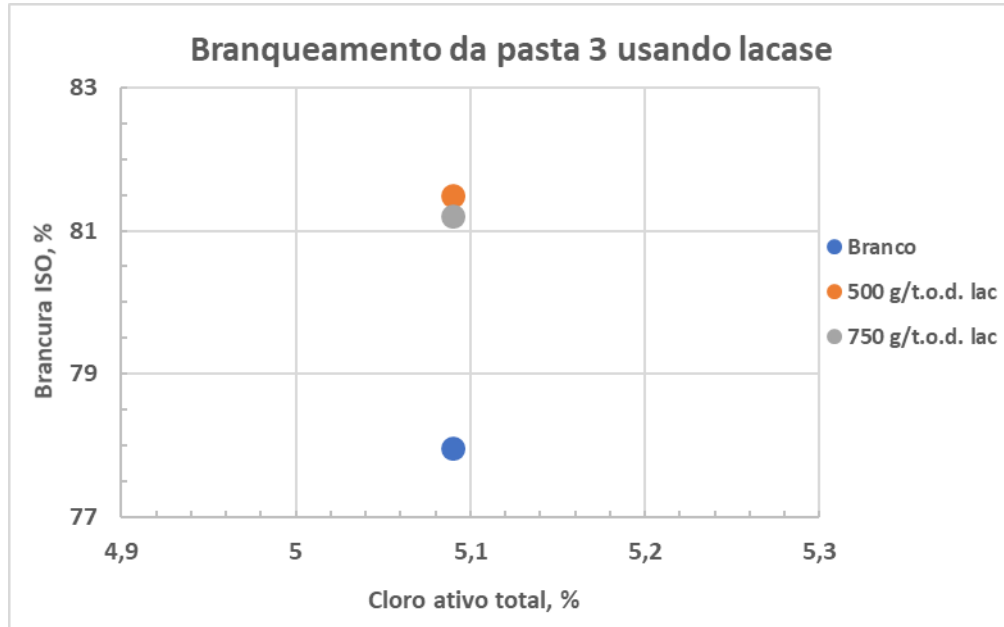


Figura 17 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento, com preparado enzimático lacase NZ-51003, da Pasta 3 após extração com hidróxido de sódio

O gráfico da Figura 17 ilustra a relação entre o ensaio em branco e os ensaios com lacase. Verifica-se que ambas as quantidades de lacase utilizadas levam a resultados muito semelhantes e distantes do resultado de referência, e, portanto, concluiu-se que a lacase estava ativa, obtendo-se o efeito pretendido, ou seja, o aumento de brancura. Nos ensaios com utilização de lacase, verificou-se um aumento da brancura, relativamente ao ensaio em branco, no entanto, comparando as duas doses testadas (500 g/t e 750 g/t), verifica-se o valor obtido foi praticamente o mesmo (81,5 e 81,2, respetivamente) e, portanto, conclui-se que, o aumento da dose de enzima acima destes valores não levará a um aumento da refletância.

4.2.2.4. Pasta 4

Com a Pasta 4, tal como com a pasta anterior (Pasta 3), inicialmente testou-se o biobranqueamento sem que esta tivesse sido sujeita ao tratamento com hidróxido de sódio. O que se verificou foi que, tal como aconteceu com a amostra de pasta anterior, a extração com NaOH era necessária para que fossem eliminados quaisquer vestígios de aditivos, e

consequentemente, fosse possível a utilização das enzimas, como se pode ver pela Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 4 sem extração com hidróxido de sódio

	X-D ₀ -E ₁				Resultados		
	Dose (g/t)	ClO ₂ (%)	H ₂ O ₂ (%)	Cloro ativo total (%)	Micro-kappa	Refletância	
						%	Desvio do branco (%)
Branco	0	3,00	1,00	5,09	3,0	77,9	--
NZ-51003	500	3,00	1,00	5,09	3,7	77,9	0
	750	3,00	1,00	5,09	4,3	77,7	-0,2

Esta tabela mostra que quando utilizada pasta original, isto é, sem qualquer tratamento antes da aplicação de enzimas, há claramente inibição da lacase, uma vez que os valores de refletância são aproximadamente iguais, independentemente da quantidade de enzima utilizada. Por esta razão, foi necessário fazer-se extração com hidróxido de sódio e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de lacase, da Pasta 4 após extração com hidróxido de sódio

	X-D ₀ -E ₁				Resultados		
	Dose (g/t)	ClO ₂ (%)	H ₂ O ₂ (%)	Cloro ativo total (%)	Micro-kappa	Refletância	
						%	Desvio do branco (%)
Branco 1	0	3,00	1,00	5,09	3,0	79,8	--
Branco 2	0	3,00	2,00	7,18	3,6	81,0	+1,2
NZ-51003	750	3,00	1,00	5,09	3,9	80,9	+1,1
	750	3,00	2,00	7,18	3,8	81,6	+0,6

Depois de feita a extração com NaOH, já foi possível verificar-se um aumento da refletância quando se utilizou lacase no processo de biobranqueamento.

Nesta situação foi ainda testada a quantidade necessária de peróxido de hidrogénio, pois sabe-se que as enzimas, ao atuarem sobre as pastas, levam à formação de grupos

cromóforos. Estes grupos dão cor escura à pasta, mas são facilmente removidos através de extração com peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Um dos ensaios que se fez foi para verificar se a quantidade de peróxido seria suficiente para eliminar a quantidade de grupos cromóforos formados. Para isso, aumentou-se a percentagem de H_2O_2 de 1% para 2%. Pelos resultados que se obtiveram, concluiu-se que o aumento de refletância não compensava esse aumento de H_2O_2 , uma vez que a brancura apenas subiu 0,6%, enquanto que, quando utilizado 1% de peróxido de hidrogénio, verificou-se um aumento mais significativo, de 1,1%.

A Figura 18 mostra a relação entre os ensaios em branco (com e sem extração) e o ensaio com enzima, todos realizados com 1% de H_2O_2 .

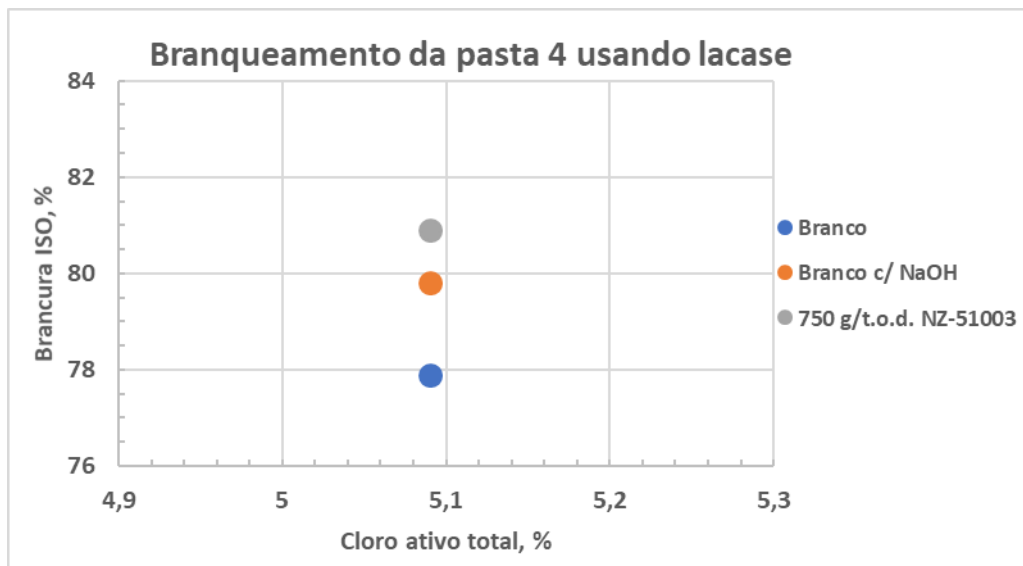


Figura 18 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento da Pasta 4 com preparado enzimático de lacase NZ-51003 1 1% de H_2O_2

A análise deste gráfico mostra que o valor de brancura do ensaio em branco (79,8) melhorou muito quando comparado com o valor registado com a pasta sem tratamento com hidróxido de sódio (77,9). Comparando estes valores com o valor do ensaio com enzima (80,9), verifica-se que houve um aumento da brancura, verificando-se assim o efeito da enzima no branqueamento da pasta.

4.2.3. Efeito complementar

O objetivo do trabalho era verificar se era possível obter a maior brancura da pasta utilizando as duas enzimas em simultâneo. O expectável era que o conjunto das enzimas resultasse numa maior brancura do que cada uma das enzimas em separado, levando assim à diminuição da quantidade de dióxido de cloro necessário para o processo de biobranqueamento. Este efeito foi avaliado nas pastas 1 e 4.

4.2.3.1. Pasta 1

Na Tabela 16 são apresentados os valores obtidos nos ensaios de branqueamento de pasta com o conjunto das duas enzimas e com redução de 25% e de 40% de oxidante total utilizado.

Tabela 16 - Resultados obtidos no branqueamento da Pasta 1 com preparado enzimático de xilanases e de lacase

Dose, g/t.o.d.		X-D ₀ -E ₁				Resultados		
Xilanases	Lacase	ClO ₂ (%)	H ₂ O ₂ (%)	Cloro ativo total		Micro-kappa	Refletância	
				%	Redução (%)		%	Desvio do branco (%)
0	0	3,00	1,00	5,09	--	2,6	77,1	--
70	500	3,00	1,00	5,09	0	2,5	81,9	+4,8
100	500	2,25	1,00	4,34	25	3,0	77,0	-0,1
100	500	1,8	1,00	3,89	40	3,7	73,9	-3,2

Com esta pasta, o ensaio em branco resultou numa pasta com 77,1% de brancura. Este valor é também conseguido com o conjunto de 100 g/t.o.d de xilanases e 500 g/t.o.d. de lacase usando menos 25% de dióxido de cloro do que o ensaio em branco. Isto significa que a ação conjunta das duas enzimas permite reduzir o oxidante total em 25%, tal como mostra a Figura 19.

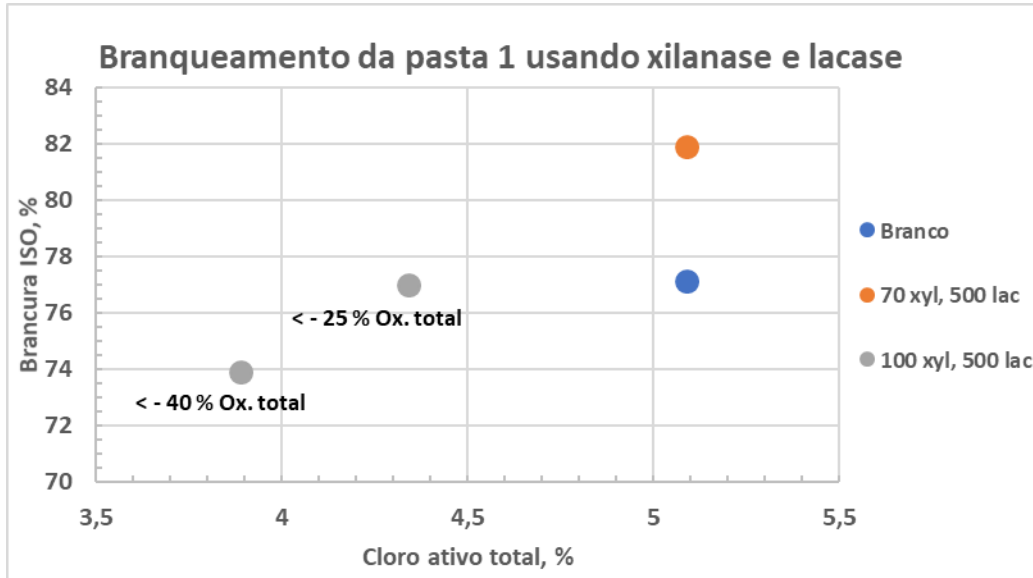


Figura 19 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento, com preparado enzimático de lacase NZ-51003 e de xilanases NS-51121, da Pasta 1

A Figura 19 permite visualizar a relação entre o ensaio em branco e o ensaio com o conjunto de enzimas. Pode concluir-se que reduzindo 40% de oxidante total, a brancura diminui muito, ou seja, esta redução é excessiva. O mesmo não se verifica quando se reduz 25%, pois, neste caso, o valor de brancura encontra-se bastante próximo do registado no ensaio em branco, confirmando o potencial de redução do consumo de dióxido de cloro pela atuação conjunta de xilanases e lacase.

4.2.3.2. Pasta 4

No caso da Pasta 4, só foi possível obter resultados com a pasta tratada com NaOH, pois de outra forma, não se registava atuação das enzimas, pelas razões já mencionadas. Foi também utilizado tampão citrato-fosfato, uma vez que se concluiu que este facilitava a atividade enzimática, pois mantém o pH constante. Na Tabela 17, estão apresentados os resultados.

Tabela 17 - Resultados obtidos no branqueamento da Pasta 4 com preparado enzimático de xilanases e de lacase

Dose, g/t.o.d		X-D ₀ -E ₁						Resultados		
Xilanases	Lacase	ClO ₂ (%)	H ₂ O ₂ (%)	Cloro ativo total		Citrato (Kg/t.a.d)	Fosfato (Kg/t.a.d.)	Micro-kappa	Refletância	
				%	Redução (%)				%	Desvio do branco (%)
0	0	3,00	1,00	5,09	--	0	0	3,8	79,8	--
100	750	3,00	1,00	5,09	0	0,648	1,28	3,2	81,7	+1,9
100	750	2,25	1,00	4,34	25	0,648	1,28	3,6	80,0	+0,2

A Tabela 17 mostra que há uma diferença de 1,9% ao nível de brancura entre o ensaio em branco, sem enzima, e o ensaio com enzimas, ambos com 3% de dióxido de cloro. Esta diferença foi de apenas 0,2% quando se reduziu a quantidade de ClO₂ para 2,25%, o que permite concluir que, tal como na pasta anterior, é possível reduzir-se a quantidade de oxidante total necessária para fazer o branqueamento, pois o valor de brancura nos dois ensaios é aproximadamente o mesmo. Como mostra a Tabela 17, esta redução foi de 25%.

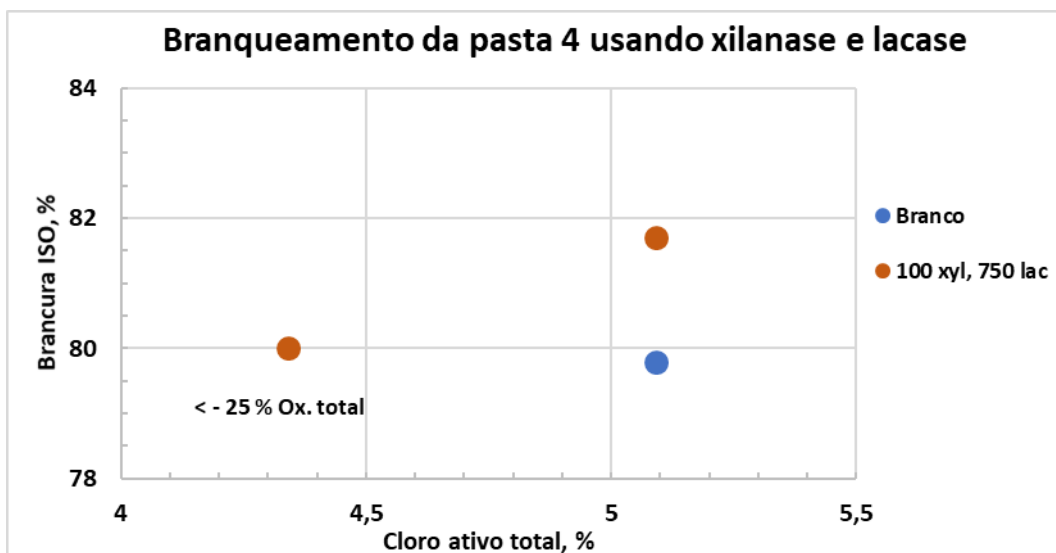


Figura 20 - Representação gráfica da refletância em função do cloro ativo total no branqueamento, com preparado enzimático de lacase NZ-51003 e de xilanases NS-51121, da Pasta 4

Através da Figura 20 conclui-se que é possível reduzir a quantidade de oxidante total, e, tal como aconteceu com a pasta testada anteriormente, a Pasta 1, consegue-se uma redução de 25% mantendo a brancura obtida pelo ensaio em branco.

4.2.4. Redução de dióxido de cloro

De acordo com os resultados apresentados, é possível reduzir a quantidade de agente oxidante através da utilização de enzimas.

Segundo dados da literatura, as enzimas estudadas – xilanases e lacase – permitem individualmente, reduzir a quantidade de agente oxidante em aproximadamente, 15% e 35%, respetivamente [23]. Esta redução, no caso da lacase é conseguida através da utilização de mediadores, no entanto, estes compostos não foram utilizados neste trabalho, sendo por isso esperado que a redução, neste caso, seja inferior. Comparando os valores obtidos (15% de redução com xilanases e 10% com lacase) com os valores já reportados, verifica-se que as percentagens de redução obtidas são equivalentes para as xilanases, mas, no caso das lacases, a redução foi muito inferior.

Isto foi comprovado com os ensaios realizados e, os resultados obtidos, encontram-se nas seguintes tabelas-resumo.

Tabela 18 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de xilanase e de lacase, da Pasta 1 com redução de ClO₂

PASTA 1								
X-D ₀ -E ₁						Resultados		
Dose, g/t.o.d.		ClO ₂ (%)	H ₂ O ₂ (%)	Cloro ativo total		Micro- kappa	Refletância	
Xilanases	Lacase			%	Redução (%)		%	Desvio do branco (%)
0	0	3,00	1,00	5,09	--	2,6	77,1	--
100	500	2,25	1,00	4,34	25	3,0	77,0	-0,1
100	500	1,8	1,00	3,89	40	3,7	73,9	-3,2

Tabela 19 - Resultados obtidos no branqueamento, com preparado enzimático de xilanases e de lacase, da Pasta 4 com redução de ClO₂

PASTA 4								
X-D ₀ -E ₁						Resultados		
Dose, g/t.o.d.		ClO ₂ , %	H ₂ O ₂ , %	Cloro ativo total		Micro- kappa	Refletância	
Xilanases	Lacase			%	Redução		%	Desvio
0	0	3,00	1,00	5,09	--	2,6	79,8	--
100	750	2,25	1,00	4,34	25	2,4	80,0	+0,2

Apesar de as condições serem diferentes, em ambas as pastas foi possível reduzir a quantidade de oxidante total em 25%. O caso da Pasta 4, tornou-se um processo mais dispendioso, pois incluiu o tratamento prévio da pasta com NaOH e foi utilizado tampão citrato-fosfato. No caso da Pasta 1 nada disto foi necessário, e, portanto, conclui-se que essa amostra de pasta não conteria o agente antimicrobiano que inativa as enzimas.

Desta forma, a utilização destas enzimas em conjunto é viável, no entanto, será mais vantajosa se se puder garantir que as pastas não contenham o tal agente antimicrobiano, pois assim, o branqueamento enzimático torna-se mais fácil e sem custos adicionais, tal como se verificou com a Pasta 1.

5. Conclusão

Neste trabalho estudou-se a utilização conjunta de xilanases e lacase no processo de branqueamento de pastas de papel, de forma a melhorar o processo em termos ecológicos, através da redução da quantidade utilizada de agentes clorados de branqueamento.

Foram testadas duas amostras de xilanases de empresas diferentes (*NS-51121* e *Serzym90*) e o que se verificou foi que com a amostra *NS-51121*, os valores de brancura das pastas obtidos foram superiores. No caso da lacase foi usada apenas a amostra *NS-51003*, produzida pela Novozymes.

Com a realização deste trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

- A presença de aditivos nas pastas industriais, nomeadamente biocidas que inativam as enzimas, pode ser eliminada através de uma etapa prévia de lavagem com hidróxido de sódio.
- Devido à presença do biocida referido, torna-se inviável a utilização de filtrado nos ensaios de branqueamento, sendo uma possível solução o uso de água.
- A determinação da atividade enzimática permitiu concluir que utilizar a solução tampão no biobranqueamento, potencia a atividade da lacase.
- O uso de xilanases no branqueamento permite uma redução de 15% do dióxido de cloro utilizado inicialmente, enquanto que, com lacase, é possível reduzir cerca de 10%.
- A aplicação simultânea das duas enzimas no branqueamento das pastas leva a uma redução do agente branqueador, dióxido de cloro, de 25%.

Como trabalho futuro sugere-se o estudo da utilização de mediadores juntamente com lacase no processo de biobranqueamento com o objetivo de se obter uma maior redução da quantidade do agente oxidante dióxido de cloro.

6. Bibliografia

6. Bibliografia

- [1] «CELPA, Associação da Indústria Papeleira». Disponível em: <http://www.celpa.pt/historia-do-papel>. [Acedido: 29-Out-2017].
- [2] CELPA - Associação da Indústria Papeleira, «Boletim estatístico de 2015- Indústria Papeleira Portuguesa», 2015.
- [3] «The Navigator Company». Disponível em: <http://www.thenavigatorcompany.com/Sustentabilidade/Floresta-Sustentavel/Eucalipto>. [Acedido: 29-Out-2017].
- [4] C. P. Neto, D. Evtuguin, P. Pinto, A. Silvestre, e C. Freire, «Química Da Madeira De Eucalyptus Globulus: Especificidades E Impacto Nos Processos De Cozimento E De Branqueamento», Prémio *Tecnicelpa* 2005.
- [5] G. Koch, «Raw material for pulp», em *Handbook of pulp*, Austria: Wiley-VCH, 2006, cap. 2, pp. 25–27.
- [6] I. S. Goldstein, «Overview of the chemical composition of wood», em *Wood Structure and Composition*, Raleigh, North Carolina: CRC Press, 1991, cap. 1, pp. 3–4.
- [7] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, e W. Wagenknecht, «General Considerations on Structure and Reactivity of Cellulose», em *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and analytical Methods*, Weinheim (Federal Republic of Germany): Wiley-VCH, 1998, cap. 2, pp. 9–10.
- [8] J. C. Roberts, «The material of paper», em *The Chemistry of Paper*, United Kingdom - UK: RSC publishing, 1996, cap. 2, pp. 20–42.
- [9] V. I. Ciolacu, Diana; Ciolacu, Florin; Popa, «Amorphous Cellulose – Structure and Characterization», *Cellulose Chemistry and Technology*, , vol. 45, n. 1–2, pp. 13–21, 2011.
- [10] R. L. Whister, «Hemicelluloses», em *Wood Structure and Composition*, Raleigh, North Carolina: CRC Press, 1991, cap. 7, pp. 287–288, 307–309.
- [11] A. Mimms, D. M. J. Kocurek, D. J. A. Pyatte, e D. E. E. Wright, «Wood Chemistry», em *Kraft Pulping*, Tappi Press, 1993, cap.1, pp. 5–7.
- [12] R. J. Thomas, «Wood: Formation and Morphology», em *Wood Structure and Composition*, Raleigh, North Carolina: CRC Press, 1991, cap. 2, p. 41.
- [13] G. Koch, «Raw material for pulp», em *Handbook of pulp*, Austria: Wiley-VCH, 2006, cap. 2, pp. 30–34.
- [14] H. Sixta, A. Potthast, e A. W. Krotschek, «Chemical Pulping Processes», em

- Handbook of Pulp*, Austria: Wiley-VCH, 2006, cap. 4, pp. 109–114.
- [15] E. Brannval, «Overview of Pulp and Paper Processes» em *Pulping Chemistry and Technology*, Eds Monica Ek, G. Gellerstedt, G. Henriksson, De Gruyter., vol. 2. Stockolm, Sweden, 2009.
- [16] E. Brannval, «Overview of Pulp and Paper Processes», em *Pulp and Paper Chemistry and Technology*, Stockolm, Sweden: De Gruyter, 2009, cap. 1, pp. 3–5, 9.
- [17] G. Gellerstedt, «Chemistry of Chemical Pulping», em *Pulp and Paper Chemistry and Technology*, Stockolm, Sweden: De Gruyter, 2009, cap. 5, p. 94.
- [18] A. Lourenço, J. Gominho, M. C. Ferreira, e H. Pereira, «Estudo do Efeito da Aplicação Enzimática no Retardar do Envelhecimento do Papel», Lisboa, Congresso Florestal Nacional: A floresta e as gentes , 2005.
- [19] H. Sixta, H.-U. Suss, A. Potthast, M. Schwanninger, e A. W. Krottscheck, «Pulp Bleaching», em *Handbook of Pulp*, Austria: Wiley-VCH, 2006, cap. 7, pp. 610–613.
- [20] G. Gellerstedt, «Chemistry of Bleaching of Chemical Pulp», em *Pulp and Paper Chemistry and Technology*, Stockolm, Sweden: De Gruyter, 2009, cap. 9, pp. 205–207, 214–225, 230–232.
- [21] C. J. Biermann, «Bleaching and Pulp Properties Calculations», em *Handbook of pulping and papermaking*, Academic Press, 2^o. 1996, cap. 17, pp. 379-394
- [22] A. P. M. Tavares, «Produção de Lacase para Potencial Aplicação como Oxidante na Indústria Papeleira», Tese de doutoramento Universidade de Aveiro, 2006
- [23] V. V. Thakur, R. K. Jain, e R. M. Mathur, «Studies on xylanase and laccase enzymatic prebleaching to reduce chlorine-based chemicals during CEH and ECF bleaching», *Bioresources*, vol. 7, n. 2, 2012, pp. 2220-2221
- [24] T. K. Kirk e T. W. Jeffries, «Enzyme-Aided Bleaching of Kraft Pulps: Fundamental Mechanisms and Practical Applications» em *Enzymes for pulp and paper processing*, American Chemical Society, 1996, cap. 2, pp. 15-24
- [25] J. I. T. Sousa, A. I. G. Moura, D. V. Evtuguin, e M. G. V. S. Carvalho, «Enzymatic treatment applied as a final stage in E. globulus kraft pulp bleaching», *Chemical Technology and Biotechnology* , vol. 91, n. 2, pp. 547–554, 2014.
- [26] S. S. Dhiman, J. Sharma, e B. Battan, «Industrial Applications and Future Prospects of Microbial Xylanases: a review», *Bioresources*, vol. 3, n. 4, pp. 1–2, 2008.
- [27] O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, S. V. Shleev, e Y. I. Yaroplov, «Laccase - mediator systems and their applications: a review», *Applied Biochemistry and Microbiology.*, vol. 43, n. 5, pp. 523–525, 2007.
- [28] A. Kunamneni, F. J. Plou, A. Bellesteros, e M. Alcalde, «Laccases and their

- applications: a patent review», *Recent Patents on Biotechnology* vol. 2, n. 1, pp. 4–15, 2008.
- [29] R. C. Sharma, Abha; Thakur, Vasanta Vadde; Shrivastava, Anita; Jain, Rakesh Kumar; Mathur, Rajeev Mohan; Gupta, Rishi; Kuhad, «Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study», *Bioresource Technology*, vol. 169, pp. 96–100, 2014.
- [30] A. P. M. Tavares, C. G. Silva, e A. M. R. B. Xavier, «Laccase Properties, Reaction Mechanisms and Applications: An Overview», em *Laccase Applications, Investigations and Insights*, New York: Nova Science Publishers, 2017, pp. 4–7.
- [31] P. Ander e K. Messner, «Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase», *Biotechnology Techniques.*, vol. 12, n. 3, pp. 191–192, 1998.
- [32] W. Paulus, *Microbiocides for the Protection of Materials: A Handbook*. Netherlands: Springer-Science Business Media, B.V, 1993.

Anexo A: exemplos de cálculo

Nesta secção estão expostos os exemplos de cálculo de cada metodologia apresentada, referentes à redução de 25% de dióxido de cloro utilizando pasta 1.

- **Determinação da pasta húmida equivalente a 50 g de pasta seca**

$$\text{Pasta húmida} = \frac{\text{pasta seca} * 100}{\text{teor de secura}} = \frac{50 * 100}{32,47} = 154 \text{ g} \quad (23)$$

- **Determinação da quantidade de enzima a utilizar**

Partindo das doses a testar neste ensaio (500 g/t lacase e 100 g/t xilanase), determinou-se a quantidade de enzima necessária para a quantidade de pasta utilizada (50 g):

$$\text{Quantidade de lacase necessária} = \frac{\text{pasta seca} * 500}{1000000 \text{ g}} = \frac{50 * 500}{1000000} = 0,025 \text{ mL} \quad (24)$$

$$\begin{aligned} \text{Quantidade de xilanase necessária} &= \frac{\text{pasta seca} * 100}{1000000 \text{ g}} = \frac{50 * 100}{1000000} \quad (25) \\ &= 0,0050 \text{ mL} \end{aligned}$$

Tendo em conta o fator de diluição da enzima, a quantidade de solução enzimática diluída utilizada determinou-se através das equações (26) e (27):

$$\begin{aligned} \text{Solução enzimática lacase} & \quad (26) \\ &= \text{Quantidade de enzima necessária} * \text{fator diluição} \\ &= 0,025 * 500 = 13 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Solução enzimática xilanase} & \quad (27) \\ &= \text{Quantidade de enzima necessária} * \text{fator diluição} \\ &= 0,0050 * 500 = 2,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

- **Branqueamento: Estágio de aplicação de enzimas**

- Determinação do volume de filtrado utilizado:

$$\begin{aligned}
 V_{\text{filtrado}} &= V_{\text{final}} - \text{Pasta húmida equivalente a } 50g \text{ secas} \\
 &\quad - \text{Solução enzimática xilanase} - \text{Solução enzimática lacase} \\
 &= 500 - 154 - 13 - 2,5 = 330,5 \text{ mL}
 \end{aligned}
 \tag{28}$$

- **Branqueamento: Estágio de aplicação de dióxido de cloro:**

- Concentração e volume de ClO_2

Tendo em conta a redução de 25% do dióxido de cloro, a percentagem deste agente oxidante utilizada foi 2,25%.

$$\text{ClO}_2(g) = 0,0225 * \text{massa pasta seca} = 0,0225 * 50,0 = 1,13g
 \tag{29}$$

A concentração de ClO_2 foi determinada segundo a equação (XX). Neste caso, o volume gasto na titulação, T_2 foi 24,272, então a concentração de ClO_2 foi:

$$\text{ClO}_2 \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{67,5 * 2,63 * 0,05 * 24,272}{4 * 5,00} = 10,77
 \tag{30}$$

$$V_{\text{ClO}_2} = \frac{\text{massa ClO}_2}{\text{concentração ClO}_2} = \frac{1,13}{10,77} = 0,105 \text{ L} = 105 \text{ mL}
 \tag{31}$$

- Volume de água utilizada no ensaio:

$$\begin{aligned}
 V_{\text{H}_2\text{O}} &= (V_{\text{total}} - \text{massa pasta seca}) - V_{\text{ClO}_2} - (\text{massa pasta húmida} \\
 &\quad - \text{massa pasta seca}) \\
 &= (500 - 50) - 105 - (154 - 50) - 0 = 241 \text{ mL}
 \end{aligned}
 \tag{32}$$

- **Branqueamento: Estágio de extração alcalina**

O raciocínio dos cálculos nesta fase é equivalente ao que foi feito nos cálculos realizados na fase anterior, sendo que as percentagens de NaOH e H₂O₂ eram de 2,1% e 1%, respetivamente.

- Determinação da concentração de H₂O₂:

$$V_{\text{gasto titulação}} = 62,59 \text{ mL} \quad (33)$$

- Concentração e volume de H₂O₂:

$$H_2O_2 \text{ (g/L)} = \frac{0,17}{2} * V_{\text{gasto titulação}} = \frac{0,17}{2} * 62,59 = 5,32 \text{ g/L} \quad (34)$$

$$V_{H_2O_2} = \frac{1\% * \text{pasta seca}}{C_{H_2O_2}} = \frac{0,01 * 50}{5,32} = 0,0940 \text{ L} = 94,0 \text{ mL} \quad (35)$$

- Volume de NaOH

A concentração de NaOH é constante e igual a 40 g/L.

$$V_{NaOH} = \frac{2,1\% * \text{pasta seca}}{C_{NaOH}} = \frac{0,021 * 50}{40} = 0,026 \text{ L} = 26 \text{ mL} \quad (36)$$

- Volume de água utilizada no ensaio:

$$\begin{aligned} V_{H_2O} &= (V_{\text{total}} - \text{massa pasta seca}) - V_{NaOH} - V_{H_2O_2} \\ &= (500 - 50) - 26 - 94,0 - (186,25 - 50) = 193,52 \text{ mL} \end{aligned} \quad (37)$$

- **Determinação do índice kappa e micro-kappa**

- Índice-kappa da pasta crua

$$IK = \frac{(V_{\text{branco}} - V_{\text{ensaio}}) * 1,983 * f}{\text{pasta} * \text{teor secura}} = \frac{(50,61 - 31,56) * 1,983 * 0,974}{10,0651 * 0,2628} = 13,91 \quad (38)$$

- Micro-kappa

A sequência de cálculo do micro-kappa é a seguinte:

$$C = \frac{(V_{\text{branco}} - V_{\text{ensaio}}) * 0,05}{0,1} = \frac{(20,138 - 10,294) * 0,05}{0,1} = 4,922 \quad (39)$$

$$P = C * 10 = 4,922 * 10 = 49 \quad (40)$$

O valor de f é determinado através do P utilizando a Tabela 5, e neste caso é f=0,998

$$\text{Micro - kappa} = \frac{C * f}{E} = \frac{4,922 * 0,998}{1,611} = 3,05 \quad (41)$$

Onde E é calculado pela multiplicação da massa usada no micro-kappa pelo teor de secura.