

Universidade Estadual de Campinas

UNICAMP

Instituto de Química

**MODO DE AÇÃO DE XILANASES DE *Aspergillus sp* 2M1 EM SEQUÊNCIAS
DE BRANQUEAMENTO DE POLPAS DE *Eucalyptus grandis* TOTALMENTE
LIVRES DE CLORO.**

TESE DE DOUTORADO



Raquel S. Angelo

Orientador: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

Campinas, 26 de março de 1999.

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	11014m
V.	Ex
TOMBO BC/	38904
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/10/99
N.º CPD	

CM-00126226-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

An43m Angelo, Raquel Simões.
Modo de ação de xilanases de *Aspergillus* SP 2M1 em sequências de branqueamento de polpas de *Eucalyptus Grandis* totalmente livres de cloro / Raquel Simões Angelo. - - Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Nelson E. Durán Caballero.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Enzima. 2. Celulose. 3. Biotecnologia. I. Caballero, Nelson E. Durán. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Aos meus pais, Ivan e Regina e
aos meus irmãos, Daniela e Renato.
Por tudo.

As minhas queridas companheiras, Clau, Anna, Carla, Paula,
Lud, Rosana, Cris, Roberta, Andréa e especialmente à Rita.
Que o que foi construído nesses 10 anos não se perca.
Seja apenas o começo de uma amizade infinita.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nelson Durán, pela orientação e, sobretudo, pela amizade.

A todos os colegas de laboratório, Sandrinha, Ana Olívia, Dárcio, Mariângelas, Natália, Denise, Airton, Ronaldo, Chico, Daniel, Josy, Rosana e Renato, pelo ótimo ambiente de trabalho e também pelo companheirismo.

Ao Pedro Fardim, não só pela ajuda material, mas também pelas longas conversas sobre a tese.

Ao Prof. Dr. Jaime Baeza e à Profa. Dra. Juanita Freer agradeço pela minha acolhida no Laboratório de Recursos Renováveis, que foi de extrema importância para o desenvolvimento desta tese.

A todo pessoal do Laboratório de Recursos Renováveis, Concepción-Chile, pela disponibilidade e cooperação.

À Carolina, pela sua amizade e pela acolhida tão calorosa que recebi. Aos queridos Samuel, Lili e Rômulo, por terem me presenteado com momentos inesquecíveis no Chile.

Aos colegas do DEBIQ-FAENQUIL, pela ajuda na resolução dos problemas cotidianos.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Abreviaturas	v
Glossário	vi
Capítulo I – Introdução geral.	
I.1 Introdução à tecnologia de fabricação da pasta celulósica.	2
I.2 Componentes estruturais da madeira.	3
I.3 Degradação enzimática das hemiceluloses.	5
I.4 Utilização de xilanases na indústria de polpa e papel.	6
Capítulo II – Objetivos gerais.	
II. Objetivos gerais da tese	11
Capítulo III – Caracterização de polpas kraft de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à sequências de branqueamento TCF com estágio enzimático.	
III.1 Introdução	13
III.1.1 Xilanases	13
III.1.2 Aplicação de xilanases na indústria de polpa e papel	14
III.1.3 Xilanases e o branqueamento totalmente livre de cloro – TCF	16
III.1.4 Modo de ação de hemicelulases em sequências de branqueamento ECF e TCF	19
III.2 Material e Métodos	
III.2.1 Material	25
III.2.1.1 Polpas	25
III.2.1.2 Microorganismo	25

III.2.1.3 Enzimas utilizadas no branqueamento	25
III.2.1.4 Reagentes	25
III.2.1.5 Meio de cultura e manutenção do fungo	26
III.2.2 Métodos	26
III.2.2.1 Preparo de inóculo	26
III.2.2.2 Obtenção do extrato enzimático	26
III.2.2.3 Caracterização do extrato enzimático	27
III.2.2.4 Condições experimentais de branqueamento	31
III.2.2.5 Controle dos processos de branqueamento	32
III.2.2.6 Determinação de lignina solúvel	35
III.2.2.7 Determinação de açúcares redutores	35
III.2.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	36
III.2.2.9 Determinação do comprimento das fibras	36
III.2.2.10 Conteúdo de metais	36
III.3 Resultados e discussão	
III.3.1 Caracterização do sistema hemicelulolítico de <i>Aspergillus sp</i> 2M1	37
III.3.2 Análise das polpas submetidas ao branqueio XOP	38
III.3.3 Análise das polpas submetidas ao branqueio XZP	40
III.4 Conclusões	56

Capítulo IV – Estudo sobre caracterização de polpas kraft de *Eucalyptus grandis* através da utilização de técnicas de análise química de superfícies.

IV.1 Introdução	58
IV.1.1 Microscopias eletrônicas de varredura e transmissão	59
IV.1.2 Microscopia de força atômica	60
IV.1.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear	62
IV.1.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X	64
IV.1.5 Espectroscopia no infravermelho e infravermelho próximo	67
IV.2 Material e Métodos	
IV.2.1 Material	72

IV.2.1.1 Polpas	72
IV.2.2 Métodos	72
IV.2.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão	72
IV.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura	72
IV.2.2.3 Microscopia de força atômica	72
IV.2.2.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear	73
IV.2.2.5 Espectroscopia no infravermelho	73
IV.2.2.6 Espectroscopia no infravermelho próximo	73
IV.2.2.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X	73
IV.2.2.8 Análise de componentes principais	74
IV.3 Resultados e discussão	
IV.3.1 Seleção das técnicas de análise de superfícies	75
IV.3.2 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X	79
IV.3.3. Espectroscopias de FTIR e NIR com aplicação de PCA	85
IV.3.3.1 FTIR	85
IV.3.3.2 NIR	94
IV.4 Conclusões	99
 Capítulo V – Conclusão final	
V. Conclusão final	101
Atividades desenvolvidas no período	102
Referências bibliográficas	105
Apêndice 1	117
Apêndice 2	118
Apêndice 3	119
Apêndice 4	120
Apêndice 5	121
Apêndice 6	122
Apêndice 7	123

RESUMO

Modo de ação de xilanases de *Aspergillus* sp 2M1 em sequências de branqueamento de polpas de *Eucalyptus grandis* totalmente livres de cloro.

Autora: Raquel S. Angelo

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

Lab. Química biológica, Instituto de Química – Unicamp. C.P 6154 Campinas, S.P.

Polpas kraft sulfato marrom de eucalipto foram branqueadas através de sequências de branqueamento totalmente livres de cloro (XOP e XZP), utilizando enzima obtida no laboratório (Asperzyme 2M1), com variação da carga enzimática, temperatura de incubação, tempo de incubação e substrato indutor para produção da enzima. As amostras obtidas foram submetidas às análises físico/químicas convencionais de caracterização de polpas de celulose e às análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), microscopia de força atômica (MFA), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e infravermelho próximo (NIR) e espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C). Os efluentes gerados durante o pré-tratamento com xilanase também foram recolhidos e submetidos à análises de teor de açúcares redutores e lignina solúvel.

Os resultados indicaram um melhor desempenho das polpas enzimaticamente tratadas em todas as sequências de branqueamento estudadas, sendo observado um efeito cooperativo entre xilanase e outras enzimas do extrato xilanolítico, principalmente glucuronidase. Polpas pré-deslignificadas com oxigênio apresentaram um comportamento distinto frente ao branqueamento e à ação da enzima quando comparadas às polpas kraft sem a pré-deslignificação. O efeito da ação da xilanase pôde ainda ser observado na composição de açúcares das polpas e no teor de açúcares redutores e lignina solúvel dos efluentes gerados.

As análises de superfície mostraram que as técnicas de espectroscopia no infravermelho e infravermelho próximo, juntamente com espectroscopia de fotoelétrons excitados raio-X, podem ajudar na caracterização do comportamento das polpas durante os vários estágios do branqueamento. As análises de microscopia eletrônica de varredura e força atômica demonstraram utilidade para a caracterização morfológica da superfície das polpas e, suportadas pelas análises químicas, podem ser úteis no estudo da ação das enzimas no branqueamento de polpas kraft.

O emprego de análise de componentes principais - PCA possibilitou utilizar os resultados espectroscópicos de FTIR e NIR para diferenciar as polpas submetidas ao pré-tratamento enzimático dos seus respectivos controles. O estudo preliminar indicou que, numa continuidade do trabalho, este método deve contribuir para obtenção de informações relevantes à respeito das alterações químicas relacionadas às diferenças encontradas.

Palavras chave: xilanase, polpa de celulose, branqueamento, modo de ação, caracterização.

ABSTRACT

Mode of action of *Aspergillus* sp 2M1 xylanase on totally chlorine free bleaching sequences of *Eucalyptus grandis*.

Author: Raquel S. Angelo

Professor: Dr. Nelson Durán

Lab. Química biológica, Instituto de Química – Unicamp. C.P 6154 Campinas, S.P.

Unbleached *Eucalyptus grandis* kraft pulps were submitted to TCF bleaching sequences (XOP – Xylanase/Oxygen/Peroxide and XZP – Xylanase/Ozone/Peroxide) using a non-commercial enzyme (Asperzyme 2M1) at the X stage. During the enzymatic treatment, the xylanase charge, inducted carbon source, incubation temperature and incubation time were changed. The pulp samples obtained after bleaching were characterized by conventional physico/chemical analyses of cellulose and pulp and by scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM respectively), atomic force microscopy (AFM), x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), fourier transformed infrared (FTIR), near infrared (NIR) and carbon 13 solid state magnetic resonance spectrometry with cross polarization and magic angle spinning (CP/MAS ^{13}C – NMR). The effluents were collected and characterized by reducing sugar and soluble lignin contents.

The results indicated a better performance of xylanase treated pulps than the control ones into all bleaching sequence studied, it has been observed a cooperative effect between α -glucuronidase and β -xylanase. The oxygen pre-delignified pulps showed a distinct behavior when compared with the non pre-delignified pulps, with increase on their bleachability. The enzyme action was also affected by the oxygen pre-delignification. The effect of xylanase treatment could be observed in the carbohydrate composition of pulps and in the profiles of reducing sugars and lignin contents of effluents too.

The surface analyses showed that FTIR, NIR and XPS spectroscopies could be able to help in the characterization of pulps during TCF bleaching. The microscopic techniques demonstrated that the morphologic study together with the chemical analyses could be very useful tools in the mode of action in enzymatic bleaching sequences.

Finally, the application of PCA permitted an improvement in the utilization of spectroscopical data of FTIR and NIR and demonstrated that it is possible to differentiate cellulose bleached pulps by these techniques.

Keywords: xylanase, pulp, bleaching, TCF, mode of action, characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de celulose.	3
Figura 2. Precursores da lignina: álcoois cumárico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III).	4
Figura 3. Modelo proposto para lignina de folhosas.	4
Figura 4. Distribuição dos componentes estruturais da madeira.	5
Figura 5. Representação de O-acetil-arabinofurano-4-O-metilglucuranoxilana.	6
Figura 6. Modelo de degradação enzimática da xilana.	7
Figura 7. Decomposição do peróxido de hidrogênio.	17
Figura 8. Oxidação radicalar dos carboidratos com formação de carbonilas.	18
Figura 9. Resumo dos possíveis modos de ação de xilanases em branqueamento de polpa de celulose.	24
Figura 10. Atividade de β-xilanase em extratos enzimáticos de <i>Aspergillus sp</i> 2M1.	38
Figura 11. Atividades relativas de β-xilosidase e α-glucuronidase em extrato enzimático de <i>Aspergillus sp</i> 2M1.	39
Figura 12. Teor de glicose de polpas de eucalipto após tratamento com xilanase de <i>Aspergillus sp</i> 2M1.	43
Figura 13. Teor de xilose de polpas de eucalipto após tratamento com xilanase de <i>Aspergillus sp</i> 2M1.	43
Figura 14. Determinação do número kappa de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 90 min.	44
Figura 15. Determinação da viscosidade de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 90 min.	45
Figura 16. Determinação de lignina solúvel nos efluentes. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 90 min.	45
Figura 17. Determinação de açúcares redutores nos efluentes.	46

Figura 18. Determinação do número kappa de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 180°C e 90 min.	47
Figura 19. Determinação da viscosidade de polpas polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 180°C e 90 min.	48
Figura 20. Determinação de lignina solúvel nos efluentes. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 180°C e 90 min.	48
Figura 21. Determinação do número kappa de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 40°C e 12 h.	49
Figura 22. Determinação da viscosidade de polpas polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 40°C e 12 h.	50
Figura 23. Determinação de lignina solúvel nos efluentes. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 40°C e 12 h.	50
Figura 24. Comparação entre as seletividades dos processos de branqueamento com e sem pré-deslignificação com O₂. Condições estágio X: 50°C e 90 min.	52
Figura 25. Determinação de metais. Branqueamento (O)XZP.	54
Figura 26. Distribuição do comprimento médio das fibras das polpas analisadas.	55
Figura 27. Determinação de “coarseness” das fibras de polpas kraft de eucalipto.	55
Figura 28. Esquema representativo de um microscópio de força atômica.	62
Figura 29. Esquema de um equipamento de XPS e princípio de emissão de fotoelétrons de raio-X.	65
Figura 30. Transformação do ácido 4-O-metilglucurônico (A) em ácido hexenurônico (B) durante a polpação kraft.	84
Figura 31. Espectros de DRIFT de polpas de celulose – Sequência (O)XZP.	85
Figura 32. Gráfico de “scores” para aplicação de PCA em espectros de FTIR. Branqueamento XZP – Condições do estágio X: 90 min e 50°C.	87
Figura 33. Gráfico dos “loadings” para as componentes principais 2 e 3. Branqueamento XZP - Condições do estágio X: 90 min e 50°C.	88

Figura 34. Análise dos espectros das sequências XZP através de PCA “unfolded”. A) estágio X: 90 min e 50°C. B) estágio X: 180 min e 50°C. C) estágio X: 12 h e 40°C.	90
Figura 35. Gráfico de “scores” para aplicação de PCA aos espectros de FTIR. Branqueamento XZP com pré-deslignificação com O₂ – (O)XZP.	91
Figura 36. Gráfico dos “loadings” para as componentes principais 1 e 2. Branqueamento XZP com pré-deslignificação com O₂ – (O)XZP.	92
Figura 37. Gráfico de “scores” na aplicação de PCA “unfolded” aos espectros de FTIR. Branqueamento XZP com pré-deslignificação com O₂ – (O)XZP.	93
Figura 38. Comparação entre as sequências de branqueamento XZP e (O)XZP. Utilização de espectroscopia de FTIR e análise de componentes principais.	95
Figura 39. Espectros de NIR de polpas de celulose. Sequência (O)XZP.	96
Figura 40. Gráfico de “scores” da análise PCA/NIR – XZP (X: 90 min e 50°C.)	96
Figura 41. Gráfico de “scores” da aplicação aplicação de PCA aos espectros de NIR de polpas de celulose submetidas ao branqueamento TCF (matriz “unfolded”).	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais do branqueamento XOP.	33
Tabela 2. Condições experimentais do branqueamento XZP.	33
Tabela 3. Atividades enzimáticas de sistemas induzidos por diferentes xilanas.	37
Tabela 4. Valores de kappa e viscosidade de polpas sem pré-deslignificação com O₂.	40
Tabela 5. Valores de kappa e viscosidade de polpas com pré-deslignificação com O₂.	40
Tabela 6. Caracterização de polpas kraft submetidas ao branqueamento XZP.	41
Tabela 7. Lignina solúvel e açúcares redutores dos efluentes – Sequência XZP.	42
Tabela 8. Caracterização de polpas kraft submetidas ao branqueamento (O)XZP.	51
Tabela 9. Composição de açúcares das polpas kraft submetidas à sequência (O)XZP.	52
Tabela 10. Análise das polpas kraft e lignina de eucalipto através de XPS.	79
Tabela 11. Distribuição da concentração atômica de C 1s e O 1s.	80
Tabela 12. Razões O/C total e C/C parciais da análise de XPS.	81
Tabela 13. Análise de XPS das polpas de celulose após extração com DCM.	83

ABREVIATURAS

C	Estágio de branqueamento com cloro
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D	Estágio de branqueamento com dióxido de cloro
E	Extração alcalina entre dois estágios de branqueamento
ECF	Branqueamento livre de cloro elementar
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MFA	Microscopia de força atômica
NIR	Espectroscopia no infravermelho próximo
O	Estágio de branqueamento com oxigênio
P	Estágio de branqueamento com peróxido de hidrogênio
PCA	Análise de componentes principais
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
TCF	Branqueamento totalmente livre de cloro
U	Unidades de atividade enzimática
X	Estágio de branqueamento com xilanase
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X
Z	Estágio de branqueamento com ozônio

GLOSSÁRIO

Branqueamento : (branqueio). Denominação ao processo posterior à polpação, que visa a remoção da lignina residual da polpa de celulose. É composto de vários estágios que podem alternar processos oxidativos da lignina com processos de extração alcalina e lavagem da polpa.

% ISO: forma de representar os resultados de alvura em porcentagem da alvura do óxido de magnésio (MgO), considerada igual a 100.

Kraft: (polpação kraft). Denominação ao processo de polpação comercial mais utilizado pela indústria de polpa e papel.

Número kappa: medida do teor de lignina residual da polpa. É o número de mililitros de uma solução de permanganato de potássio equivalente a 0,1N consumida por 1g de celulose seca. Os resultados são corrigidos para dar um consumo de 50% de permanganato em contato com o corpo de prova.

(O)XZP / (O)XOP: representação de sequências de branqueamento totalmente livres de cloro (respectivamente xilanase/ozônio/peróxido de hidrogênio e xilanase/oxigênio/peróxido de hidrogênio) de polpas de celulose pré-deslignificadas com oxigênio (representado por (O)).

XZP / XOP: representação de sequências de branqueamento totalmente livres de cloro (respectivamente xilanase/ozônio/peróxido e xilanase/oxigênio/peróxido de hidrogênio) de polpas de celulose sem a pré-deslignificação com oxigênio.

CAPÍTULO I

Introdução geral

I.1 - Introdução à Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica.

O processo de obtenção da polpa de celulose a partir de matéria prima vegetal é milenar. Ao longo dos tempos foi adaptando-se às necessidades crescentes impostas pelo progresso da sociedade, ganhando grande impulso após a revolução industrial no século XVIII, que teve como consequências o aumento da demanda por difusão e alteração de normas de contabilidade e controle escrito, incremento dos meios de comunicação e da educação via jornais, livros escolares e obras literárias entre outros.

O processo de polpação (separação das fibras vegetais mediante utilização de energia mecânica e/ou química) como é conhecido atualmente começou a ser desenvolvido a partir da segunda metade do século passado, quando iniciaram-se os estudos e desenvolvimento dos processos químicos de polpação começando pelo processo com soda cáustica seguido pelo processo bissulfito (ácido). Hoje, esses processos estão divididos basicamente em dois grandes grupos: os de alto rendimento, onde encontram-se os processos mecânicos, termo ou quimiomecânicos e semiquímicos de obtenção de pastas celulósicas, e os de baixo rendimento, que englobam basicamente os processos químicos de obtenção de pastas celulósicas. O processo químico mais utilizado atualmente na produção da polpa de celulose para manufatura do papel é o processo Kraft ou sulfato, que consiste no cozimento das fibras em temperaturas elevadas na presença de uma solução aquosa de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio, chamada de licor de cozimento. A denominação sulfato é derivada da aplicação de sulfato de sódio para cobrir as perdas do ciclo de recuperação dos reagentes do cozimento.

As matérias primas utilizadas na fabricação da polpa de celulose e papel variaram muito até que a utilização das fibras de madeira se tornasse a fonte de maior importância econômica. São utilizadas as fibras de madeira de árvores do grupo das dicotiledôneas arbóreas (Angiospermas) e do grupo das coníferas (Gimnospermas). As primeiras também são usualmente conhecidas como folhosas ou madeiras duras (hardwood), e as segundas como resinosas ou madeiras moles (softwood). As espécies de madeira mais utilizadas no Brasil pertencem ao gênero *Eucalyptus*, destacando a espécie *Eucalyptus grandis* como a de maior importância econômica. Também são produzidas polpas de celulose de pinus (*Pinus elliottii*, *Pinus taeda* e *Pinus caribae*) mas em menor escala. Apesar de não serem árvores

nativas (o eucalipto é proveniente principalmente da Austrália e Tasmânia e o pinus tem origem européia), a utilização destas espécies ganhou destaque devido principalmente ao seu rápido crescimento, que é de três a quatro vezes superior que em seus países de origem (Philipp e D'Almeida, 1988).

1.2 Componentes Estruturais da madeira.

A madeira é constituída basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, cabendo a esta última conferir rigidez à madeira. Os dois primeiros componentes estão intimamente associados, formando múltiplas camadas de fibras ligadas entre si por forças interfibrilares e pela lignina que age como ligante.

A celulose é o maior componente da madeira, apresentando-se como um polímero polissacarídeo linear formado exclusivamente de unidades de D-glicose unidas através de ligações do tipo β -1,4 (Figura 1).

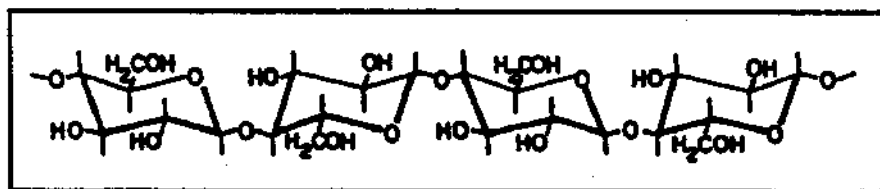


Figura 1. Esquema representativo de um fragmento de celulose.

A lignina por sua vez, é resultante da polimerização dehidrogenativa de três precursores primários: os álcoois trans-coniferílico, trans-sinapílico e trans-p-cumárico (Figura 2.). Como o processo ocorre de forma aleatória, o produto final da biossíntese da lignina é uma macromolécula de estrutura tridimensional, altamente ramificada e de peso molecular bastante elevado. A lignina presente na madeira, portanto, varia muito de espécie para espécie. Uma generalização contudo pode ser feita, dividindo-as em dois grandes grupos: as ligninas de madeiras moles são formadas predominantemente das unidades dos álcoois trans-p-cumárico e trans-coniferílico, enquanto as ligninas de madeira dura são constituídas das três unidades indistintamente (Angelo, 1995). Um exemplo de uma estrutura para a lignina de madeira dura pode ser vista na Figura 3.

A hemicelulose consiste numa mistura de polímeros heteropolissacarídeos de baixa massa molecular, ou seja, ao contrário da celulose, diversos tipos de açúcares podem estar presentes em sua formação (pentoses e hexoses) dando origem a cadeias moleculares mais curtas e com alto grau de substituição. Cada heteropolissacarídeo geralmente apresenta uma cadeia principal formada por uma única unidade, podendo apresentar diversas outras unidades como substituintes (Philipp e D'Almeida, 1988).

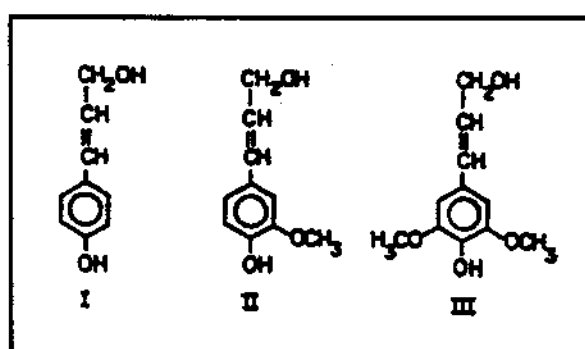


Figura 2. Precursores da lignina: álcoois cumárico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III).

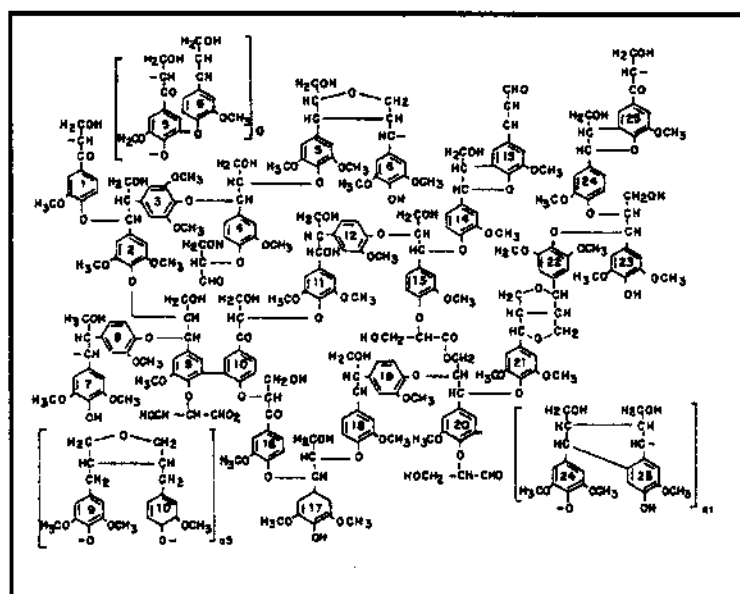


Figura 3. Modelo proposto para lignina de folhosas (Nimz, 1974).

Embora os três componentes acima sejam constituintes de qualquer tipo de madeira, as suas proporções não são idênticas em todas elas (Figura 4.). De um modo geral o percentual de celulose se mantém na mesma faixa, enquanto observa-se um aumento na quantidade de hemicelulose em detrimento à lignina no caso das madeiras duras (Figura 4B).



Figura 4. Distribuição dos componentes estruturais da madeira.

A maior parte da hemicelulose presente nas madeiras é constituída por xilana, ou seja um polímero polissacarídeo cuja cadeia principal é composta por unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. A cadeia principal pode apresentar ainda, substituições do tipo α -1,2 ou α -1,3 dos seguintes resíduos: ácido glucurônico, ácido D-galactourônico, grupos acetil, L-arabinose, D-galactose, entre outros. Nas madeiras duras quase a totalidade da hemicelulose é composta de O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana. Já as madeiras moles contém maiores proporções de D-manose e apresentam uma composição majoritária de arabinoxilanas e minoritária de galactomananas. Resíduos dos ácidos ferúlico e cumárico podem ainda apresentar-se esterificados aos substituintes do tipo L-arabinose como mostrado na Figura 5. (Phillip e D'Almeida, 1988; Angelo, 1995).

I.3 Degradação enzimática das hemiceluloses.

As hemiceluloses podem ser degradadas enzimaticamente por um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas. O conjunto de enzimas responsável pela degradação das xilanas é denominado sistema xilanolítico, cuja principal enzima é a β -xilanase, responsável pela clivagem das ligações β -1,4 entre as unidades de xilose não substituídas. As outras enzimas constituintes deste grupo enzimático são responsáveis pela

hidrólise dos oligômeros de baixa massa molecular resultantes (β -xilosidades), ou pela hidrólise das ligações α dos substituintes (α -L-arabinosidades, α -D-galactosidades, α -D-glucuronidas, acetil-esterases e feruloil ou cumaril esterases) (Figura 6.). A principal fonte de enzimas xilanolíticas são os fungos de degradação branca da madeira (white rot fungi) e algumas espécies de bactérias (Angelo, 1995).

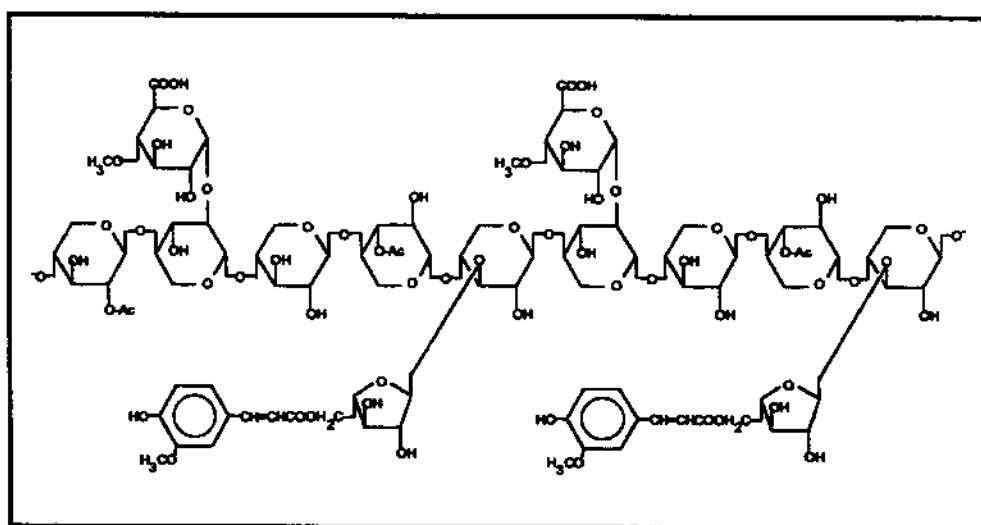


Figura 5. Representação de O-acetil-arabinofurano-4-O-metilglucuranoxilana.

I.4 Utilização de xilanases na indústria de polpa e papel.

No início da década de 80, em consequência às crescentes exigências com a qualidade dos resíduos das indústrias de polpa e papel por parte de diferentes agências de países do Primeiro Mundo, iniciou-se a busca de alternativas para o processo de produção de polpa e de reformulações na área de tratamento de efluentes. Dentre os vários métodos sugeridos para minimizar o impacto ambiental foram ganhando destaque aqueles que buscavam na biotecnologia soluções para os problemas apontados.

A evolução destes novos conceitos de biorremediação ambiental acabou por criar um complexo quadro de utilização destas novas técnicas dentro da indústria de polpa e papel, com aplicação, principalmente da tecnologia enzimática, nas diversas fases do processamento industrial da madeira. Alguns exemplos de utilização de enzimas e/ou microorganismos dentro do processo de manufatura da polpa de celulose podem ser assim

resumidos: utilização de pectinases no descascamento das madeiras, biodeslignificação dos cavacos por fungos ligninolíticos, biobranqueamento das polpas com xilanases, ligninases e lacases, tratamento dos efluentes por enzimas ligninolíticas ou pelos fungos degradadores da madeira entre outros (Durán e col, 1995; Durán, 1996).

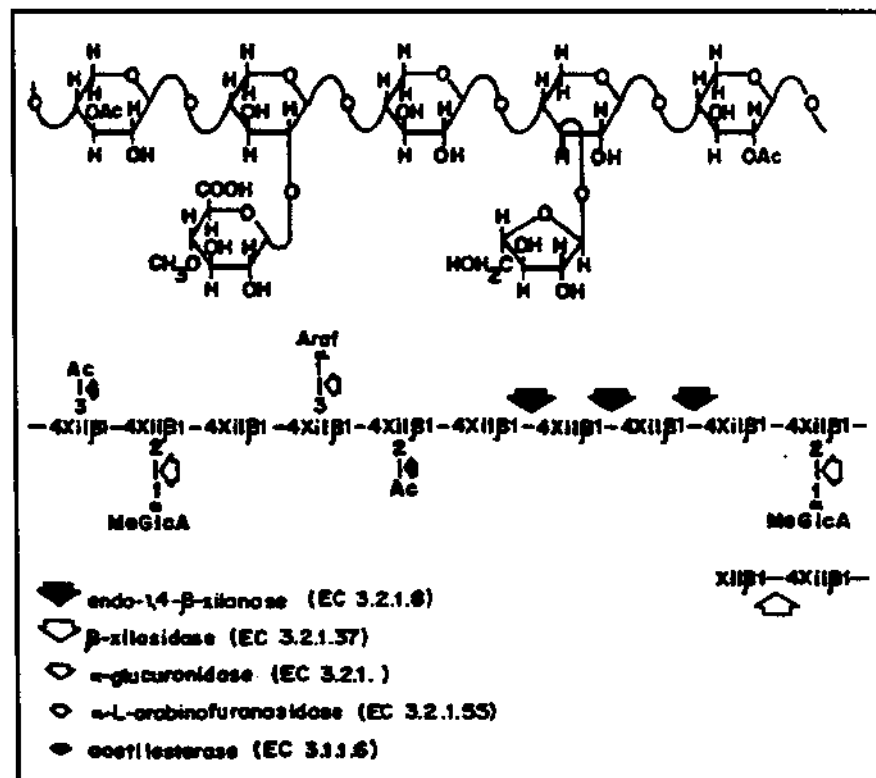


Figura 6. Modelo de degradação enzimática da xilana (Coughlan e Hazlewood, 1993).

É na etapa do branqueamento da polpa, que convencionalmente utilizava cloro elementar como agente oxidante da lignina residual, que aparecem as substâncias mais nocivas ao meio ambiente, como por exemplo os organoclorados. Desta maneira, a busca por efluentes menos tóxicos tornou-se em grande parte uma luta pela conquista de técnicas de branqueamento isentas de cloro e seus derivados. Os resultados imediatos desta nova corrente foram a implementação das sequências de branqueamento livre de cloro elementar (ECF), a otimização da deslignificação com oxigênio e a utilização de enzimas no processo de branqueamento da polpa. Atualmente, estudos envolvendo sequências totalmente livres

de cloro (TCF), utilização de novas enzimas oxidativas e operações em circuito fechado também são temas de muitos estudos.

A utilização das xilanases num estágio precedente ao branqueamento foi inicialmente sugerido em 1986 (Buchert e col., 1994; Wong e col., 1997a). Os estudos indicavam que sua utilização facilitava a remoção posterior da lignina residual, reduzindo a quantidade necessária dos agentes oxidantes durante o branqueamento e consequentemente melhorando o impacto ambiental dos efluentes gerados. As vantagens da utilização das xilanases (economia de reagentes, boa qualidade da polpa e efluentes menos tóxicos) motivaram estudos posteriores (Senior e col., 1992; Senior e Hamilton, 1993; Yang e Eriksson, 1992) de modo que no início da década de 90 algumas indústrias do setor já investiam em seu uso comercial. Ao final de 1994, por exemplo, cerca de 75000 toneladas de polpa tinham sido tratadas com xilanases em seis indústrias canadenses, representando 8% da produção total do país. Hoje a utilização rotineira de xilanases já está estabelecida na Europa e Canadá, com companhias biotecnológicas oferecendo preparações das enzimas para adição em polpas durante o branqueamento, as quais diferem em pureza, atividade enzimática por volume, temperatura e pH ótimos (Tolan e col., 1995; Wong e col., 1997a).

A maneira pela qual as xilanases melhoram o desempenho das polpas de celulose durante o branqueamento foi, e ainda é, alvo de muitos trabalhos. As hipóteses mais conhecidas têm em comum o fato de que a enzima aumenta a exposição das fibras, mas o mecanismo exato de atuação das xilanases dentro do processo todavia não foi completamente esclarecido. Uma das hipóteses sugeria que a utilização da enzima causaria uma perda física na parede celular das fibras por despolimerização parcial das cadeias de hemicelulose, resultando na formação de microporos e aumentando a área específica da polpa (Clark e col., 1991). Outra hipótese argumenta que a xilana reprecipitada sobre a superfície da fibra, graças à queda da alcalinidade após o cozimento, age como uma barreira à extração da lignina residual. Neste caso, tratamentos com xilanases seriam capazes de remover parcialmente esta xilana aumentando o contato das fibras com os agentes oxidantes (Kantelinen e col., 1993). A terceira hipótese baseia-se na hidrólise da xilana localizada nas camadas intermediárias das fibras, possibilitando a liberação de fragmentos de

lignina que estivessem ligadas aos polissacarídeos através de ligações químicas álcali resistentes (Paice e col., 1992).

Os estudos envolvendo xilanases e os processos de branqueamento de polpas de celulose estão em fase bastante adiantada e o domínio desta tecnologia é imprescindível atualmente. Apesar dos avanços deve-se ressaltar que os trabalhos com enfoque sobre as madeiras duras, em especial *Eucalyptus grandis*, tiveram pequena contribuição no cenário inicial, mas são de grande importância para países como Brasil e Austrália, que possuem participação importante no mercado internacional do setor.

Dentro deste contexto, o presente trabalho se propôs a estudar a ação de enzimas xilanolíticas no branqueamento de polpas kraft de *Eucalyptus grandis* submetidas a sequências de branqueamento totalmente livres de cloro.

CAPÍTULO II

Objetivos

II. Objetivos gerais da tese

O contexto apresentado neste trabalho permitirá verificar que os estudos sobre utilização de xilanases nos processos de branqueamento de polpa celulósica estão bastante diversificados e adiantados. Entretanto, invariavelmente a atenção está voltada para os processos que envolvem madeiras moles, tanto como fonte de polpa como fonte de meio indutor para as enzimas. Sendo assim, este trabalho foi iniciado com a proposta de caracterizar polpas kraft de *Eucalyptus grandis* submetidas a sequências de branqueamento totalmente livres de cloro com estágio de tratamento enzimático, com a intenção de ajudar a esclarecer o papel desempenhado pelas enzimas dentro do processo e poder contribuir para o desenvolvimento de métodos alternativos de branqueamento de polpas de eucalipto.

Para este fim, o trabalho dividiu-se em duas partes complementares:

📖 Uma parte do trabalho de tese concentrou-se em estudar sequências de branqueamento TCF com e sem utilização de pré-tratamento com enzimas hemicelulolíticas, no caso xilanases fúngicas, caracterizando as polpas obtidas através de análises convencionais tais como: número kappa, composição de açúcares, viscosidade da fibra, alvura, comprimento médio das fibras, análise de açúcares e lignina residual dos efluentes.

📖 Outra parte do trabalho, num estudo paralelo, teve o objetivo de caracterizar as polpas de celulose resultantes do branqueamento através de técnicas de análise de superfície (Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X-XPS, espectroscopia no infravermelho-FTIR e infravermelho próximo-FTNIR, espectroscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear de carbono-13 entre outros).

CAPÍTULO III

***Caracterização de Polpas Kraft de Eucalyptus grandis
Submetidas à Sequências de Branqueamento TCF com
Estágio Enzimático.***

III.1 Introdução

III.1.1 Xilanases

Atualmente é de consenso geral classificar as xilanases como endo-glicanases ou endo-glicosil hidrolases que podem ser subdivididas em dois grandes grupos: as famílias F/10 e G/11. Essa divisão baseia-se geralmente na análise de agrupamentos hidrofóbicos e na homologia da sequência de DNA. A família F/10 corresponde às xilanases de maior massa molecular (a partir de 30-35 KDa), enquanto a família G/11 é composta pelas enzimas com massas moleculares menores, ao redor de 20KDa.. A família G/11 é composta de endoxilanases de baixo peso molecular altamente específicas, formando um grupo muito homólogo de enzimas. Já as endoxilanases da família F/10, embora demonstrem grande versatilidade, possuem baixa especificidade, podendo catalisar a hidrólise de substratos de celulase. Em geral as enzimas pertencentes à família G/11 possuem pH ótimo ao redor de 5, enquanto as pertencentes à família F/10 apresentam ponto isoelétrico mais baixo que as da família G/11 (Jeffries, 1996).

As famílias F/10 e G/11 possuem em comum o caráter endo de clivagem das ligações glicosídicas e o mecanismo de hidrólise da xilana. As enzimas de ambas as famílias têm se mostrado aptas a hidrolisar a ligação glicosídica β -1,4 da xilana, com retenção da configuração anomérica do açúcar, sugerindo que a hidrólise do substrato deve seguir um mecanismo de dupla substituição envolvendo dois resíduos de ácido carboxílico (Krengel e Dijkstra, 1996). Os grupos catalíticos são compostos de dois resíduos glutamato, localizados em oposição um ao outro na abertura do sítio ativo. O papel de um glutamato é agir como uma catalisador ácido/base com o outro resíduo servindo como um nucleófilo estabilizador do intermediário de reação (Torronen e Rouvinen, 1997).

Apesar das semelhanças, as xilanases das duas famílias podem apresentar alta variação nas suas propriedades funcionais, como atividade catalítica, padrões de clivagem dos substratos, pH ótimo e estabilidade térmica. Xilanases microbianas pertencente às famílias F/10 e G/11 diferiram em sua ação na hidrólise de 4-O-metilglucuranoxilana: as enzimas da família F/10 não precisam de altas unidades consecutivas não substituídas na cadeia principal, sugerindo que seus sítios ativos sejam menores que as da família G/11. Até

mesmo xilanases dentro de uma mesma família podem ter propriedades bastante distintas (Biely e col., 1997).

A importância em elucidar as relações estrutura-funcionalidade de xilanases está intimamente ligada à sua utilização pelas indústrias de alimentos e de polpa de celulose e papel, principalmente estas últimas. É de grande interesse a manipulação de enzimas termicamente mais estáveis, com pH ótimos em meios alcalinos e de fácil obtenção. Dentro desta esfera de ação muitos trabalhos têm sido publicados, com enfoque na bioquímica molecular e clonagem das xilanases. Karlsson e col. (1998) clonaram gene de xilanase bacteriana em *E. coli* obtendo uma enzima com pH ótimo de 7,5, temperatura ótima de 80°C e alta estabilidade térmica ($t_{1/2}$ de 1h e 40 min). Outros trabalhos têm se mostrado interessados na caracterização molecular das xilanases, com ênfase em elucidar alterações estruturais e/ou melhorar as propriedades das enzimas através de técnicas de DNA recombinante, visando melhor desempenho no processo de branqueamento da polpa de celulose (Muilu e col., 1998; Durand e col., 1998; Inagaki e col., 1998).

Além de estudos moleculares, muitos trabalhos sobre a bioquímica das xilanases têm sido publicados. O enfoque principal neste caso é obter novas enzimas microbianas, caracterizando-as quanto às suas propriedades bioquímicas (pH, temperatura, cinética de ativação e de inibição, indução da atividade enzimática entre outros) para adaptação aos diversos processos de branqueamento de polpas de celulose. Exemplo disto pode ser visto em trabalho de Breccia e col. (1998), que purificaram e estudaram xilanases de bactéria, caracterizando-as com respeito à sua especificidade frente ao substrato e ao modo de hidrólise. Outro trabalho investiga a cinética do tratamento enzimático de polpas em diferentes temperaturas (Valchev, 1998), enquanto vários estudos publicados são dirigidos à produção, purificação e caracterização de xilanases álali-resistentes (Genesse e Mamo, 1998; Kalogeris e col., 1998; López e col., 1998).

III.1.2 Aplicação de xilanases na indústria de polpa e papel

A utilização de xilanases em sequências de branqueamento é uma realidade dentro da indústria papeleira mundial. A adoção do estágio de tratamento enzimático ganhou força

principalmente porque o cloro elementar foi praticamente eliminado de todas as plantas industriais e o sistema de branqueamento ECF com dióxido de cloro se estabeleceu como sequência convencional adotada. A utilização destas enzimas tornou-se assim uma das alternativas para reduzir a quantidade de ClO_2 requerida (visando melhorar qualidade final do efluente e minimizar gastos com a produção do próprio reagente) e também para aumentar a eficiência do branqueamento, já que o cloro elementar possuía um poder oxidativo bem maior que o dióxido de cloro. Deve-se salientar ainda que as exigências do mercado atual privilegiam o comércio de produtos manufaturados através de processos biotecnológicos, com menor grau de impacto ambiental possível. Exemplo disto foi apresentado por Christov e Prior (1998) que relataram em seu trabalho como a indústria de polpa e papel Sul Africana, maior causa de poluição ambiental daquela nação, pôde remediar o problema investindo na utilização de enzimas hemicelulolíticas e em biodegradação da lignina por fungos de decomposição da madeira.

Alguns trabalhos avaliaram a extensão e o efeito do tratamento enzimático em sequências de branqueamento utilizadas pelas indústrias de polpa e papel (Suurnakki e col., 1994; Leduc e col., 1995; Tolan e Guenette, 1997). Mansfield e col. (1996a) examinaram o potencial de utilização de enzimas hidrolíticas para melhorar as propriedades de resistência das fibras de polpas químicas e mecânicas. Combinações de xilanases com peróxido de hidrogênio, dimetildioxirano e nitrilamina numa etapa anterior a uma sequência de branqueamento DEDED apresentaram bons resultados, com redução na carga de ClO_2 utilizada (Hamilton e col., 1996).

Tolan & Guenette (1997), avaliaram a utilização de xilanases em sequências de branqueamento livres de cloro elementar (ECF) e totalmente livres de cloro (TCF). Em sequência ECF de cinco estágios, a polpa enzimaticamente tratada alcançou maior grau de alvura, com economia na quantidade de ClO_2 utilizada de 14,5%, sendo que este valor mostrou tendência a aumentar em sequências com menor número de estágios. Além da economia de reagentes a utilização da enzima proporcionou queda na descarga de compostos organoclorados tanto nas polpas resultantes quanto nos efluentes. Nestes últimos ainda foi verificado o decréscimo da cor e maior facilidade de degradação microbiana, constituindo a vantagem mais citada pelas plantas industriais implementadoras deste processo. Os autores

ainda verificaram que qualidade da polpa, de uma maneira geral, não se altera com a utilização das enzimas. O trabalho também ressalta o interesse atual na combinação do tratamento enzimático com estágios de branqueamento sem derivados clorados (por exemplo oxigênio e peróxido de hidrogênio). A aplicação industrial de xilanases em polpas pré-deslignificadas com oxigênio foi avaliada em estudo posterior, apresentando resultados semelhantes (Tolan e Thibault, 1998).

Vários trabalhos continuam estudando a aplicação de xilanases em sequências de branqueamento de polpas de celulose buscando enzimas cada vez mais adequadas e benéficas aos processos (Jeffries e col., 1997; Chen e col., 1997; Chinnaraj e col., 1997). Garg e col. (1998) realizaram estudo comparativo entre duas xilanases comerciais e um extrato cru de xilanase isolado de *Streptomyces thermoviolaceus* para aplicação em sequência de branqueamento CEDED de polpa de bétula, com redução no consumo de ClO_2 em cerca de 30-35%. Os estudos de aplicação de novas xilanases em sequências de branqueamento são necessários porque cada tipo de polpa e processo pode ter uma resposta frente a um tratamento enzimático específico, ou seja, os preparados comerciais não atuam com a mesma eficiência sobre qualquer tipo de polpa.

O desenvolvimento de sequências de branqueamento ECF que utilizam agentes oxidantes não clorados em substituição a um dos estágios com dióxido de cloro também têm ganho bastante atenção e a aplicação conjunta com xilanases parece promissora (Aumont e col., 1996; Curotto e col., 1998; Senior e col., 1998). No estudo de uma sequência de branqueamento (X)DEP foi obtida uma polpa final com maior índice de alvura e viscosidade, com redução de 26 a 42% no consumo de dióxido de cloro em relação à polpa controle. As características do efluente também foram melhores para a sequência com utilização de xilanases, com redução na cor e no conteúdo de compostos orgânicos halogenados (AOX) (Curotto e col., 1998).

III.1.3 Xilanases e o Branqueamento Totalmente Livre de Cloro - TCF

O desenvolvimento de sequências de branqueamento totalmente livres de cloro - ou TCF - foi uma resposta à crescente exigência pela eliminação dos compostos

organoclorados dos efluentes. Logo no início dos trabalhos a utilização de oxigênio, ozônio e peróxido de hidrogênio ganhou destaque porque os reagentes apresentaram grande poder oxidativo, sendo possível a obtenção de polpas de celulose com índices de alvura tão altos quantos aqueles obtidos pelo branqueamento convencional.

O grande desafio dos novos processos encontra-se na produção de uma polpa com alto grau de alvura que mantenha as propriedades físicas das polpas convencionais. Isto porque as espécies oxidantes utilizadas para deslignificar a polpa podem promover uma despolimerização da celulose através de reações secundárias com radicais livres gerados pela decomposição destas espécies (Chirat e Lachenal, 1994).

Alguns dos últimos trabalhos publicados preocupam-se muito com esta questão, apresentando estudos relacionados às reações radicalares indesejáveis. Exemplos de reações secundárias que podem ocorrer durante o branqueamento TCF podem ser vistas nas Figuras 7 e 8 (Kishimoto e Nakatsubo, 1998; Suss e col., 1998). As conclusões destes trabalhos sugerem que parâmetros como pH, temperatura e presença de alguns metais necessitam ser bem controlados para obtenção de polpas de melhor qualidade.

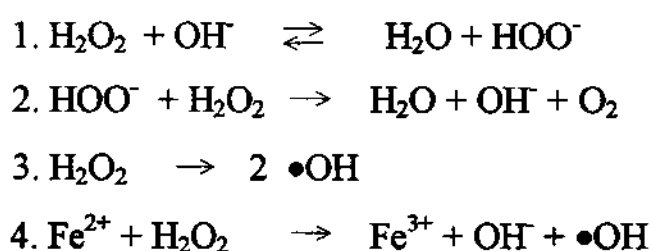


Figura 7. Decomposição do peróxido de hidrogênio (Kishimoto e Nakatsubo, 1998).

1. formação do reagente de branqueamento. 2. decomposição do peróxido em meio altamente alcalino. 3. decomposição do peróxido em temperatura elevada. 4. Decomposição do peróxido por metais. Ex: reagente de Fenton.

A otimização dos processos TCF vem proporcionando obtenção de polpas branqueadas até altos índices de alvura sem que ocorra perda significativa na qualidade final da fibra. Bons resultados têm sido encontrados em sequências totalmente livres de cloro com estágio de tratamento com xilanases seguido de estágios oxidativos com ozônio e peróxido (Yang e

col.,1994; Lan Pham e col.,1995; Wong e col., 1996a; Suurnakki e col., 1996a.). A aplicação de xilanases, por vezes, ajuda a melhorar algumas propriedades físicas das polpas submetidas a branqueamentos TCF. Em trabalho com polpa de abeto, as amostras tratadas com xilanases apresentaram ganho em alvura de até 3 pontos (%ISO), acompanhados de redução no número kappa e liberação de compostos de alta massa molecular nos efluentes. Foi verificado ainda que o efeito positivo das enzimas não era uniforme, variando dependendo do tamanho da fibra da polpa (Mansfield e col., 1996b).

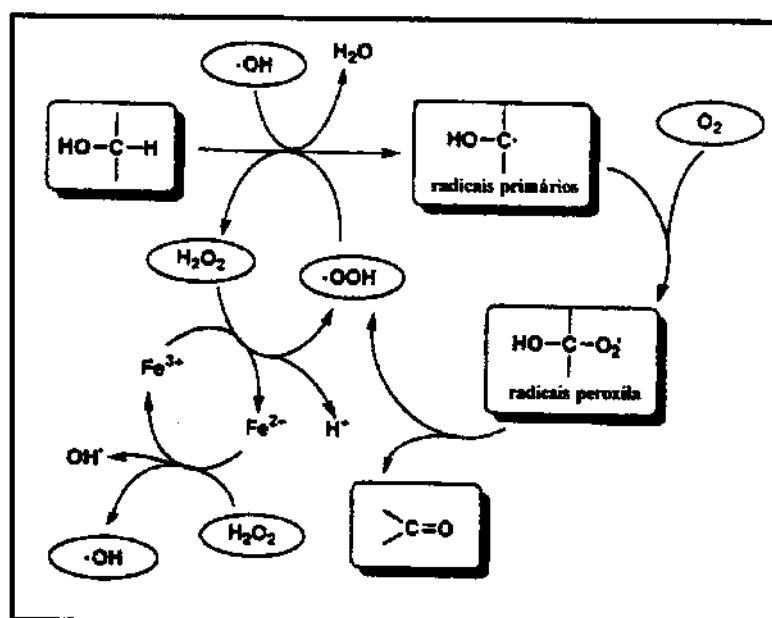


Figura 8. Oxidação radicalar dos carboidratos segundo Suss e col. (1998).

Alguns trabalhos vêm demonstrando a importância do tratamento com xilanases e/ou pré-deslignificação com oxigênio para a manutenção da qualidade final da fibra de celulose, seja ela de madeiras duras ou moles (Furhmann e col.,1996; Nelson e col.,1996). A otimização do tratamento enzimático, com estágios de remoção de íons metálicos durante uma sequência de branqueamento TCF, resultou em um melhor aproveitamento do tratamento enzimático e etapas subsequentes (Buchert e Viikari, 1995). A adição de um tratamento com xilanase antes e depois do estágio de branqueamento com peróxido aumentou a branqueabilidade de três diferentes polpas kraft (Douglas-fir; Western hemlock

pré deslignificada com oxigênio e Aspen), com obtenção de valores mais altos na alvura final em todos os casos (Wong e col., 1997b).

Embora já bastante adiantados, poucos trabalhos envolvendo sequências de branqueamento TCF se preocuparam em avaliar a toxicidade final dos efluentes gerados (Stauber e col., 1996). Num estudo superficial, foi verificado que os efluentes eram altamente tóxicos, incluindo aqueles liberados após estágio de tratamento com xilanase. A toxicidade verificada aparentemente foi consequência da alta concentração de material orgânico nos efluentes. Porém, sua biorremediação por fungos se mostrou rápida e eficiente (Angelo e col., 1995).

A apresentação de trabalhos envolvendo polpas de eucalipto, apesar de restrita a poucos grupos, tem mostrado que a utilização de xilanases apropriadas promove aumento da branqueabilidade da polpa em todos os estágios do branqueamento. Vicuña e col. (1997) apresentaram redução no consumo de ClO_2 entre 12 e 40% e alvura de 90%ISO em sequência de branqueamento XDOEOPD1 de polpas kraft de *Eucalyptus grandis*. Grande parte dos trabalhos estão relacionados com sequências de branqueamento totalmente livres de cloro (Vidal e col., 1997; Angelo e Durán, 1998; Vidal e col., 1998). Também foi mostrado que as características finais da polpa são influenciadas pela atuação das enzimas durante o branqueamento (Yang e col., 1993; Bajpai e col., 1993).

III.1.4 Modo de ação de hemicelulases em sequências de branqueamento ECF e TCF

A compreensão do modo de ação das xilanases dentro do branqueio de polpa de celulose é uma parte importante dentro da área de polpa e papel, podendo ser estudada sob diferentes ângulos. Os trabalhos procuram um melhor esclarecimento do modo de ação das xilanases e o estabelecimento de um critério para determinação de quais enzimas são mais efetivas no branqueamento (Elegir e col., 1995; Allison e col., 1995). Os estudos envolvendo modo de ação das enzimas sugerem ampla e minuciosa investigação tanto das características intrínsecas das enzimas quanto das características estruturais das polpas antes e depois do tratamento enzimático. Isto porque é verificado uma grande diferença nas propriedades finais das polpas obtidas no processo enzimático, apesar de, em muitos casos, aparentemente não ser verificado grandes divergências entre as enzimas utilizadas ou entre as polpas de

partida. De um modo geral, os trabalhos precisam unir uma vasta gama de técnicas diferentes para a caracterização química e física das polpas (Watanabe e col., 1996; Wong e col., 1996b; Wong e col. 1997b,c; Suurnakki e col., 1996b,c; Buchert e col., 1997b; Mansfield e col., 1997).

Num extenso e minucioso levantamento, Wong e col. (1997a) revisaram as aplicações de xilanases na indústria de polpa e papel desde seu início e traçaram um histórico de toda a evolução da área. O trabalho voltou-se com grande atenção para os diferentes enfoques sobre as enzimas dentro de cada processo, verificando como é amplo e diversificado o conjunto de modificações sofridas pelas polpas que podem ser atribuídas ao uso de xilanases. Os autores verificaram, entre outras coisas, que geralmente os efeitos benéficos das enzimas são sentidos mais nas sequências de branqueamento que utilizam cloro e derivados do que naquelas onde são utilizados agentes oxidantes tais como peróxidos e ozônio. A conclusão do levantamento sugere que os experimentos sejam cuidadosos e levem em conta que as diferenças no processo de branqueamento podem acarretar alterações no modo como as enzimas comportam-se.

Um conceito já bem estabelecido sustenta que a extensão do aumento na branqueabilidade pelo tratamento enzimático depende da enzima utilizada. O tamanho e o tipo da enzima também são importantes fatores, já que enzimas menores podem penetrar melhor nas fibras do que enzimas maiores. Maiti e Whitnire (1997) verificaram que a redução no consumo de cloro elementar, através de pré-tratamento enzimático com xilanases, para uma dada sequência de branqueamento foi duas vezes superior para as polpas de madeira dura. O trabalho demonstrou que o tamanho molecular da enzimas e a estrutura molecular dos poros das fibras podem determinar a quantidade de lignina a ser removida: utilizando polpas de madeiras moles foi encontrado que polpas tratadas com xilanases com pesos moleculares de 20, 39 e 67KDa apresentaram remoção respectivamente de 48, 39 e 30% da lignina residual. Além destas influências, no entanto, a própria hemicelulose e lignina da polpa podem sofrer modificações durante o processo de polpação, podendo alterar o comportamento das enzimas em questão (Saake e col., 1995).

Além das xilanases, mananases (hemicelulases que catalisam hidrólise da manana, liberando resíduos de manose) também foram utilizadas em estudos de branqueamento de

acordo com sua atividade frente a substratos comerciais solúveis. Apesar de testadas em polpas de madeira mole, naturalmente com maior conteúdo de manana que as polpas de madeiras duras, mananases não tiveram o desempenho esperado. As xilanases em particular, mostraram-se efetivas independente do tipo de polpa, indicando que a hidrólise da xilana da hemicelulose deve ser mais significativa na modificação das características das fibras do que a hidrólise de outros polissacarídeos. Poucos casos de mananases e outras hemicelulases com bom desempenho têm sido reportados, geralmente em sequências de branqueamento envolvendo madeiras moles (Gubitz e col., 1996; Suurnakki e col., 1996a; Buchert e col., 1997a).

O modo de despolimerização da hemicelulose de madeiras moles por mananases e xilanases foi estudado por Gubitz e col. (1997). De um modo geral, os produtos finais da hidrólise de mananas e xilanas pelas respectivas enzimas foram compostos de dímeros e trímeros dos açúcares correspondentes. No entanto, nos estágios iniciais das hidrólises, xilanases e mananases apresentaram comportamentos distintos. Algumas enzimas mostraram preferência pela clivagem da cadeia polissacarídea a começar pelo meio, e outras atuaram inicialmente pelas extremidades. Também foi encontrada uma relação entre a remoção enzimática de xilanas e mananas por hemicelulases em polpas de pinus e bétula e o aumento do tamanho dos poros das fibras (Suurnakki e col., 1997). A acessibilidade da xilana e glucomanana em polpas Kraft e sulfito submetidas a vários métodos de cozimento, com posterior tratamento enzimático e branqueamento com peróxido, foi analisada por Buchert e col. (1995 a,b).

Outros trabalhos enfocam os efeitos dos tratamentos enzimáticos sobre as superfícies das fibras de celulose, e buscam compreender o modo de ação das enzimas e o local onde a ação ocorre nas fibras (Suurnakki e col. 1996 b,c). Segundo Allison e col. (1996), somente as hemiceluloses especificamente localizadas perto da superfície da fibra (inclusive a xilana e glucomanana que reprecipitam durante o cozimento) parecem estar envolvidas no processo de pré-branqueamento enzimático.

Laine e col. (1996b) estudaram as propriedades de polpas Kraft de madeiras duras e moles não branqueadas, submetidas a um tratamento com xilanase e mananase de *Trichoderma reesei*. A quantidade e a acessibilidade dos grupos carboxílicos da superfície

das polpas foram analisadas usando adsorção de polieletrólitos catiônicos e titulação potenciométrica. O estudo constatou que os grupos laterais de ácido urônico da xilana são mais acessíveis nas superfícies de fibras de madeiras duras. Jeffries e col. (1998) estudaram o mecanismo de redução do número kappa e cor através da aplicação de xilanases. A conclusão parcial do trabalho indica que uma significativa parte da redução do número kappa atribuída à utilização de xilanases deve estar relacionada com mecanismos distintos da liberação do ácido hexenourônico (um derivado insaturado do ác. Glucurônico presente nas xilanas, oxidável e que pode responder por parte do índice kappa), sendo portanto, o processo de modificação dos carboidratos mais complexo do que uma simples degradação enzimática.

Durante o branqueamento de polpa kraft de *Pinus radiata* com xilanases verificou-se que polpas previamente oxigenadas mostraram-se mais acessíveis à ação da enzima. Tal comportamento não pode ser explicado através de técnicas de análise de compressão da polpa, acessibilidade de microporos ou natureza dos solubilizados e ligações das fibras. Foi sugerido que o processo de deslignificação por oxigênio desloca a xilana ou aumenta a acessibilidade física das regiões da parede da fibra que sejam ricas em xilana (Clark e Allison, 1996).

Outro trabalho sugere que a formação de ligações covalentes entre a lignina e a xilana é responsável pelo estímulo à branqueabilidade que as xilanases exercem sobre polpas kraft. Foi observado, ao isolar a xilana das polpas, que a massa molecular total dos componentes dos carboidratos e da lignina das polpas decrescia. A persistente associação entre lignina e xilana durante os experimentos indicou que complexos de lignina e xilana são hidrolisados pelas xilanases durante o tratamento enzimático (Wong e col., 1996b). Conclusão semelhante foi encontrada em estudo do comportamento de polpas modelo, preparadas através da deposição de lignina e/ou xilana sobre polpas de celulose em condições alcalinas, durante processo de deslignificação constituído de três etapas (XQP). Um índice de 14% da xilana adicionada redepositou-se sobre as fibras. Entretanto os números kappa não excederam 1, indicando que somente uma pequena quantidade de compostos oxidáveis (ligninas e grupos cromóforos de açúcares) havia precipitado. Após o estágio X, as polpas modelo com redeposição de lignina e xilana apresentaram aumento imediato na alvura e a análise dos

filtrados indicou que somente as polpas contendo xilana adicional liberaram açúcares. A distribuição da massa molecular do material solubilizado sugeriu que são formadas ligações lignina-carbohidrato durante a redeposição da lignina e xilana sobre as fibras, e que as xilanases podem hidrolisar parcialmente estes complexos. Apesar de também ter sido observada a formação de xilana cromófora durante o cozimento alcalino, os resultados indicaram que a hidrólise desta classe de compostos durante o tratamento enzimático é limitada (De Jong e col., 1997).

Wong e col. (1997c) realizaram uma revisão abrangendo estudos sobre substratos alvo de xilanases durante o branqueamento de polpas de celulose. O trabalho enfatiza a complexidade do mecanismo de ação destas enzimas dentro do processo e aponta as linhas gerais atuais que formam seu perfil.

Algumas observações relevantes deste trabalho indicam que uma parte dos carboidratos, mais diretamente a hemicelulose, deve contribuir aos índices de número kappa e até mesmo à cor da polpa através de grupos cromóforos. A hidrólise enzimática contribuiria, portanto, com o aumento da branqueabilidade caso estivesse atuando sobre os grupos cromóforos da própria xilana, sobre complexos xilana-lignina hidrolisáveis, xilana que causa bloqueio físico da lignina na polpa ou a xilana que afeta o intumescimento da polpa (Figura 9). Também há uma preocupação em relatar que os substratos de xilanases podem variar conforme os processos de polpação e branqueamento, permitindo que a enzima melhore o desempenho das polpas durante o branqueamento através de mecanismos indiretos (no caso dos branqueamentos convencionais) ou diretos (branqueamentos TCF com peróxido).

Nesta etapa do trabalho foram caracterizadas polpas kraft de eucalipto, submetidas a distintas condições de branqueamento, através de análises químicas convencionais. A origem das polpas estudadas, a fonte indutora de xilanases e a carga de enzimas utilizada foram algumas das variáveis dos processos estudados.

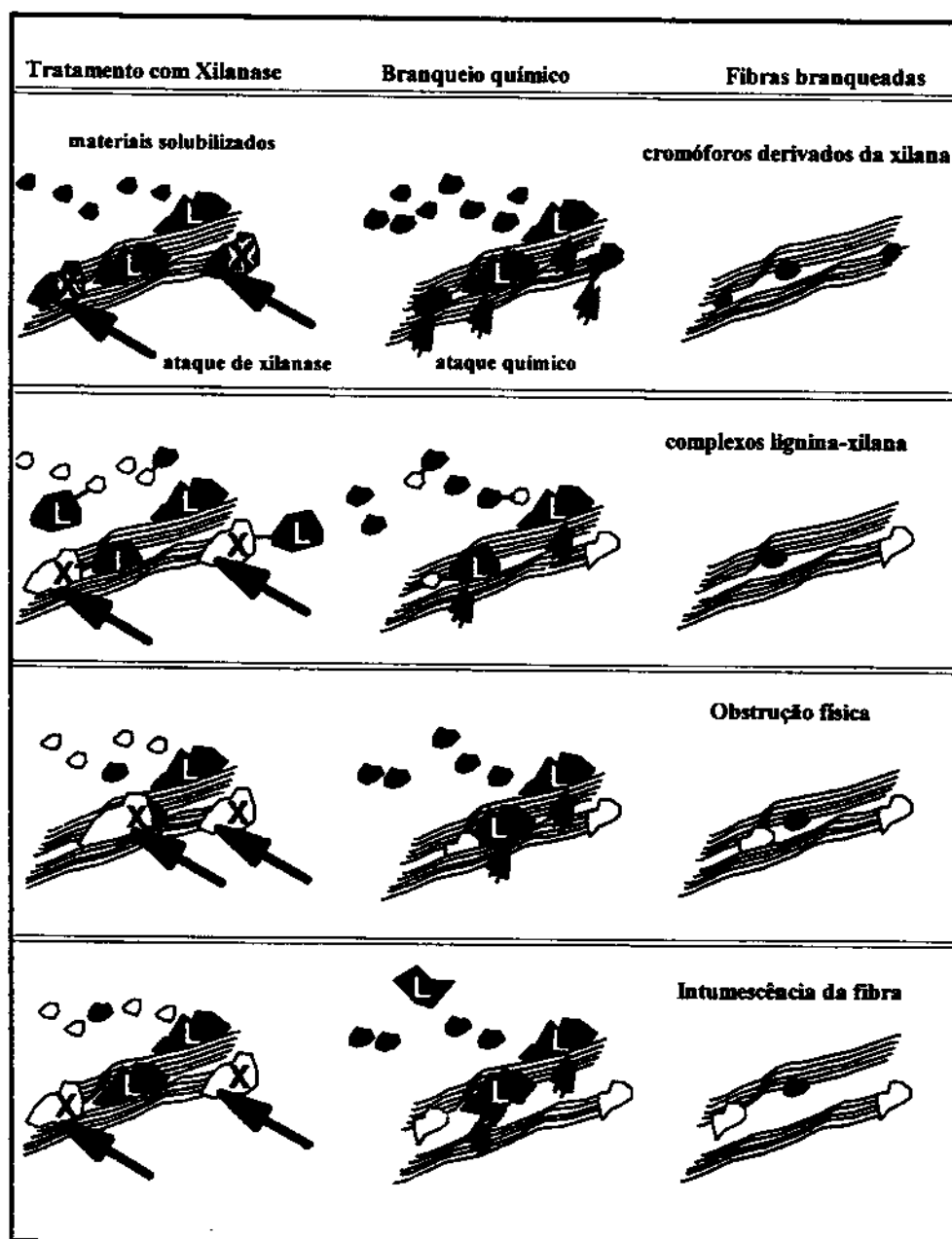


Figura 9. Resumo dos possíveis modos de ação de xilanases em branqueamento de polpa de celulose (Wong e col., 1997c).

III. 2 Material e Métodos

III. 2.1 Material

III. 2.1.1 Polpas: Foram utilizadas polpas kraft de eucalipto sulfato marrom sem pré-deslignificação com oxigênio (kappa inicial 15,3 e viscosidade 36,4 cp para sequência XOP e kappa 17,6 com 35,4 cp para sequência XZP), e com pré-deslignificação com oxigênio (polpa sulfato marrom – kappa inicial 13,7 e viscosidade 30,4 cp).

III. 2.1.2 Microorganismo: O microorganismo utilizado neste trabalho, para obtenção do extrato enzimático de xilanase, foi o fungo *Aspergillus cervinus* 2M1, isolado de madeiras do Sul do Chile, na Universidade de Valparaíso – Chile (Curotto e col., 1993).

III. 2.1.3 Enzimas utilizadas no branqueamento: Para este fim, foi utilizado o extrato xilanolítico bruto obtido após cultivo do fungo em meio de cultura adequado (item III. 2.2.2).

III. 2.1.4 Reagentes: todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção das xilanas (SIGMA X-0502 de “bétula” e X-0627 de “oat”), de grau técnico e da xilana de eucalipto, extraída em laboratório conforme metodologia de Timell (1965) e assim descrita:

Pequenos cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis* foram triturados em um moinho equipado com peneira de mesh 40-60, obtendo-se um farelo fino que foi levado à extração com etanol absoluto em soxhlet durante cerca de 3 horas. Aproximadamente 300 g de madeira livre de extrativos foi suspensa em 5 litros de água destilada aquecida a 70-80°C, sob agitação constante. 33 mL de ácido acético glacial e 98 g de clorito de sódio foram adicionados nesta ordem e a reação prosseguiu com agitação vigorosa. Após uma hora, a mesma quantidade dos reagentes foi adicionada e este procedimento foi repetido até um tempo total de reação de 7 horas. Terminada a oxidação, o material foi deixado decantar durante a noite e posteriormente separado da solução por filtração à vácuo. Em seguida o

sólido foi lavado exaustivamente com água destilada (até ficar livre de ácido), etanol e seco ao ar. A holocelulose obtida (cerca de 70% de rendimento) foi suspensa em 2 litros de solução aquosa 24% de hidróxido de potássio em erlenmeyer apropriado. O sistema foi purgado com nitrogênio, tampado e submetido a agitação durante 8 horas à temperatura ambiente. Terminada a extração da hemicelulose, o sistema foi deixado em repouso durante uma noite e o resíduo sólido separado por extração à vácuo e lavado com 1,5 L de água destilada. A solução filtrada combinada com a água de lavagem foi despejada lentamente em 4 vezes seu volume de etanol contendo cerca de 1,5 L de ácido acético. O precipitado formado corresponde a 4-O-metil-glucuranoxilana, coletada por filtração à vácuo e lavada sucessivamente com etanol 70%, etanol absoluto e éter de petróleo antes da secagem em dessecador à vácuo.

III. 2.1.5 Meio de cultura e manutenção do fungo: O meio de cultura básico utilizado para manutenção foi o meio Vogel (Vogel,1956), contendo 1% de xilana de *Bétula* (“Birch” comercial - SIGMA) como fonte de carbono indutora. Todos os nutrientes do meio de cultura foram dissolvidos em tampão fosfato pH 6,0-50 mmolL⁻¹, a mistura foi esterelizada por autoclavagem a 112°C durante 15 minutos e depois vertida em placas de petri previamente esterelizadas da mesma maneira. Para os testes de indução enzimática, a fonte de carbono foi variada, trocando a xilana de bétula por xilanas de aveia e eucalipto.

III. 2.2 Métodos

III. 2.2.1 Preparo de inóculo: As culturas de *Aspergillus sp* 2M1 foram mantidas em meio de cultura sólido, usando xilana tipo bétula comercial como fonte de carbono indutora de enzimas, à temperatura de 28-30°C. Para o preparo do inóculo uma porção de esporos foi transferida, com auxílio de alça de platina, do estoque para novas placas.

III 2.2.2 Obtenção do extrato enzimático: ½ placa de meio de sólido contendo fungo crescido, cultivado durante 5 dias em meio de cultura apropriado, foi cortada em pequenos

cubos e o material foi transferido para recipiente contendo 15 mL de tampão acetato pH 5,3 50 mmol L⁻¹. Após 20 - 30 minutos de agitação o caldo obtido foi centrifugado, filtrado sucessivamente em papel de filtro e em membrana “millipore” 0,45 µm e estocado em geladeira (Angelo e col,1997).

III. 2.2.3 Caracterização do extrato enzimático: A caracterização do extrato xilanolítico seguiu determinação das atividades enzimáticas descritas a seguir (o equipamento utilizado em todos os casos foi o Espectrofotômetro HITACHI DU 2000) :

a) β-D-Xilanase: A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da xilana, de acordo com o método de Bailey e col.(1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS - Miller,1959.)

A solução de xilana 1% (pv⁻¹) foi preparada a partir de 1 g de xilana tipo bétula comercial dissolvida em 80 mL de tampão acetato de sódio, pH 5,3 50 mmol L⁻¹. A solução foi aquecida até ebulição e após retornar à temperatura ambiente o volume foi completado para 100 mL com o mesmo tampão.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8 g de hidróxido de sódio, 306 g de tartarato de sódio e potássio e 8,3 g de bissulfito de sódio em 1 L de água destilada, sob agitação constante. Após total dissolução dos reagentes, foram adicionados 7,6 mL de fenol e o volume foi completado para 1,4 L com água destilada.

Um volume de 0,900 mL de substrato (solução de xilana 1%) foi colocado em tubos de ensaio que foram aquecidos em banho termostatizado à temperatura de 50°C durante 5 minutos. Em seguida foi acrescentado 0,100 mL de extrato enzimático, apropriadamente diluído em tampão acetato pH 5,3. Após 5 minutos de reação adicionou-se 1,5 mL do reagente DNS e a mistura foi aquecida durante 5 minutos em água fervente.

A reação foi paralisada com o resfriamento da solução em banho de gelo, sendo seguida da leitura da absorbância da solução em 540 nm. O espectrofotômetro foi previamente calibrado com um teste branco, onde a solução enzimática foi substituída por tampão acetato.

A curva padrão foi estabelecida a partir de xilose (MERCK), nas concentrações entre 2 e 10 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade desta capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de açúcar redutor expresso como xilose, por minuto a 50°C.

b) β -D-Xilosidade: A atividade enzimática de β -xilosidade foi determinada segundo Tan e col. (1987), num método baseado na estimativa do p-nitrofenol (pNP) liberado a partir do p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX).

Adicionou-se 0,100 mL de caldo de cultura filtrado a 0,400 mL de solução 0,2% (pv^{-1}) de pNPX em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 4,8. A reação foi conduzida durante 5 minutos a 50°C. Após o aquecimento, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 10% (pv^{-1}) de bicarbonato de sódio. As leituras de absorbância foram realizadas em 410 nm e o pNP liberado foi determinado através de curva de calibração com padrão nas concentrações entre 50 e 350 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de pNP por minuto a 50°C.

c) β -D-Glicosidase: De maneira análoga ao procedimento acima citado (item b), a atividade enzimática de β -glicosidase seguiu metodologia de Tan e col. (1987). O substrato utilizado para o ensaio foi p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG). Da mesma maneira, a atividade enzimática baseou-se na determinação da quantidade de p-nitrofenol liberado e foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol do p-nitrofenol por minuto a 50°C.

d) β -D-Mananase: O método baseia-se na liberação de açúcares redutores a partir da manana, utilizando “Locust bean Gum” 0,5% (pv^{-1}) como substrato da enzima (Ratto e Poutanen, 1988). A solução do substrato foi obtida através de suspensão em tampão citrato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,3 a 80°C.

Foi adicionado 0,500 mL de amostra do extrato enzimático filtrado, devidamente diluído em tampão citrato, a 0,500 mL do substrato durante 10 minutos à temperatura de 50°C. Após o aquecimento a reação foi paralisada com adição do reagente de DNS, e os resíduos de D-manose determinados seguindo mesmo método descrito para a determinação de xilanase (item a).

Uma unidade de mananase foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de manose por minuto a 50°C.

e) Endo e Exo Celulases: As atividades de endo- β -1,4-glucanase ou carboximetilcelulase (Cx) e exo- β -1,4-glucanase ou avicelase (C1) foram determinadas segundo técnica descrita por Tanaka e col. (1981). O método consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 0,44% (pv^{-1}) em tampão acetato de sódio 50mmol/L, pH 5,5 para determinação da atividade da fração Cx e de uma suspensão de celulose microcristalina (Avicel) a 1,1% (pv^{-1}), no mesmo tampão, para determinação da atividade da fração C1. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático a 1,00 mL dos substratos, com tempo de reação de 60 minutos a 50°C.

A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método DNS (descrito no item a) com a curva de calibração obtida a partir de glicose nas concentrações entre 1 e 5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto a 50°C.

f) Fpase: A atividade de celulase em papel de filtro foi determinada segundo Mandels e Reese (1957). Tiras de papel de filtro Watman n° 1 (50 mg) com 1,00 mL de extrato enzimático, apropriadamente diluído em tampão acetato 50 mmol L^{-1} - pH 5,5, foram aquecidas a 50°C durante o período de 60 minutos. A quantidade de açúcares redutores expressos em glicose foi calculada conforme descrito no item e). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μmol de glicose por minuto a 50°C.

g) Acetil Esterase: A determinação da atividade enzimática de acetil-esterase seguiu metodologia descrita por Rahim e Sih (1969), que baseia-se na estimativa do p-nitrofenol (pNP) liberado a partir do acetato de p-nitrofenila.

A reação foi iniciada pela adição de 0,500 mL de extrato enzimático a 0,100 mL de substrato (solução 1 g/L de pNP em metanol) já misturado a 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 60 mmol L⁻¹, pH 7,0. Após permanecer em reação à temperatura ambiente (ao redor de 25°C) durante 5 e 10 minutos o aumento na atividade óptica foi lido em 400 nm.

Cada unidade de atividade enzimática foi definida como o aumento de 0,01 unidades de absorbância em 400 nm / min mL⁻¹.

h) α-D-Glucuronidase: A determinação da atividade enzimática baseou-se em metodologia de Khandke e col. (1989). O substrato utilizado constituiu-se de solução de xilana de “larchwood” comercial 2% (pv⁻¹) em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 4,8. 0,200 mL da mistura reacional, contendo solução do substrato e o extrato enzimático, foram aquecidos durante 60 minutos a 50°C. A reação foi interrompida através da adição de 0,8 mL do reagente de sulfato de cobre ácido (Milner e Avigad, 1967) e a mistura foi aquecida em banho de água em ebulição durante 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 0,5 mL do reagente de Nelson (arsenomolibdato – Nelson, 1944) e realizada leitura da cor desenvolvida em 660 nm.

Para cálculo da quantidade de ácido glucurônico liberado utilizou-se curva padrão estipulada por Milner e Avigad. Definiu-se a unidade de atividade enzimática como a quantidade de enzima requerida para hidrólise que permite a liberação de 1 μmol de ácido 4-O-metil-α-D-glucurônico por minuto a 50°C.

i) α-L-Arabinofuranosidase: A determinação da atividade enzimática foi determinada segundo Tagawa e Kaji (1988), utilizando p-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo (pNPAF) como substrato para a enzima.

A 0,100 mL de substrato 1 mmol L⁻¹ em tampão citrato-fosfato 25 mmol L⁻¹, pH 3,8, foram adicionados 0,100 mL de extrato enzimático e a mistura foi aquecida durante 30 minutos a 30°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução de carbonato

de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e levada para leitura da absorbância em 420 nm. A quantidade de pNP liberada foi quantificada através de curva de calibração com padrão.

Uma unidade de arabinofuranosidase corresponde à quantidade de enzima que catalisa liberação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de íon nitrofenolato por minuto a 30°C .

j) α -D-Galactosidase: A determinação da atividade enzimática seguiu método descrito por Ratto e Poutanen (1988). O substrato utilizado consistiu de uma solução 1 mmol L^{-1} de p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (pNFG) em tampão citrato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,3. 0,100 mL de extrato enzimático foram aquecidos com 0,900 mL de substrato durante 10 minutos a 50°C . Após interrupção da reação pela adição de 0,5 mL de bicarbonato de sódio 1 mol L^{-1} , o p-nitrofenol liberado foi quantificado através de curva de calibração padrão com leituras de absorbância a 400 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima responsável pela liberação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ do p-nitrofenol por minuto a 50°C .

Todos os ensaios para determinação de atividade enzimática foram realizados em duplicata.

III. 2.2.4 Condições experimentais de branqueamento: As sequências de branqueamento da polpas de celulose consistiram em três etapas distintas: tratamento com xilanase (X), tratamento com ozônio ou oxigênio (Z ou O respectivamente) e tratamento com peróxido de hidrogênio (P).

Na realização da sequência XOP, foram utilizados três extratos enzimáticos distintos, obtido de culturas de *Aspergillus sp* 2M1 em três fontes de carbono diferentes (vide item III. 2.1.5). No estudo realizado com as sequências XZP, no estágio de tratamento com xilanases foram variados o tempo de incubação (90 min, 180 min e 12 h), a fonte indutora de enzima (xilana de bétula ou eucalipto), a temperatura de incubação (40°C e 50°C) e a carga de enzima aplicada (4 U/g e 10 U/g). As variáveis alteradas neste estudo basearam-se em conhecimento prévio das propriedades da xilanase em questão (Angelo, 1995; Angelo e col., 1997). Entre um estágio e outro as polpas foram lavadas com água e caracterizadas. Um resumo das condições das sequências de branqueamento é mostrado nas tabelas 1 e 2.

Inicialmente a polpa foi colocada em saco de polietileno e as condições do meio ajustadas com água e ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para a adição da enzima. Após adicionar-se o volume necessário de enzima, completou-se o volume com água destilada, de forma a alcançar-se a consistência (definição vide tabela 1) final desejada, e a mistura foi levada à incubação em banho termostatizado. Neste experimento a carga de enzima, a temperatura, o tempo de incubação e fonte de carbono indutora foram variados, conforme segue na tabela abaixo.

Para o estágio com oxigênio foram adicionados à polpa todos os reagentes conforme especificado na tabela 1. A consistência foi ajustada pela adição de água e a mistura homogeneizada manualmente. A polpa foi então transferida para um reator previamente purgado com nitrogênio que, quando alcança a temperatura desejada, tem o nitrogênio descarregado e o oxigênio injetado até atingir a pressão estipulada para a reação.

O estágio de ozonização foi conduzido em um sistema contendo um rotovapor acoplado a um ozonizador OEC-OZOCV - L0802X. Após ajuste da consistência da polpa previamente acidificada por filtração à vácuo e separação das fibras por aeração, a polpa foi deixada sob fluxo de ozônio por um período suficiente para que a carga ministrada à polpa fosse de 0,5% de O_3 / g polpa seca. Para recolhimento do efluente desta etapa, a polpa teve sua consistência novamente ajustada, pela adição de água destilada, para o valor utilizado nos demais estágios (10%). A seguir, as amostras foram lavadas exaustivamente com água para proceguimento do estágio com peróxido.

Na etapa de tratamento com peróxido de hidrogênio, as polpas foram novamente colocadas em sacos de polietileno, acrescentados reagentes e volume de água necessários às condições reacionais, e a mistura foi levada à incubação por tempo determinado em banho termostatizado. Neste estágio os efluentes foram recolhidos por filtragem direta das polpas após a incubação com peróxido.

III. 2.2.5 Controle dos processos de branqueamento: Todos os estágios de branqueamento foram controlados seguindo as normas ditadas pela TAPPI (TAPPI, 1988). Para a pasta não branqueada foram avaliados o número kappa (TAPPI T-236 os-76), alvura (TAPPI T-452 om 87) e a viscosidade pelo método do tubo capilar (TAPPI T-230 su-63).

Em ambos os casos as metodologias foram adaptadas à faixa de conteúdo de lignina e à quantidade de polpa utilizada.

Tabela 1. Condições Experimentais do Branqueamento XOP.

CONDIÇÕES	X (Asperz.)	O	P
Consistência de trabalho /%	10	12	12
Carga enz. /Ug polpa seca ⁻¹	4	-	-
Tempo de incubação / min	90	60	60
Temperatura / °C	50	100	65
pH inicial	5,5	-	11
Fonte de carbono indutor	Bétula, aveia e eucalipto	-	-
NaOH / %	-	1,7	-
Oxigênio / Kgf cm ⁻²	-	1,7	-
H ₂ O ₂ / %	-	-	1

% consistência = [g de polpa seca/ 100 g de polpa + água] x 100

Tabela 2. Condições Experimentais do Branqueamento XZP.

CONDIÇÕES	X (Asperzyme)	Z	P
Consistência de trabalho /%	10	40	10
Carga enz. /U g polpa seca ⁻¹	4 e 10	-	-
Tempo de incubação / min	180	Específico	180
Temperatura / °C	50	Ambiente	70
pH inicial	5,5	2,5	11
Carga O ₃ / % g polpa seca ⁻¹	-	0,5	-
Silicato / % g polpa seca ⁻¹	-	-	0,2
H ₂ O ₂ / % g polpa seca ⁻¹	-	-	1,0

% consistência = [g de polpa seca/ 100 g de polpa + água] x 100

Determinação do Número Kappa (microkappa):

Uma quantidade variável de polpa úmida, suficiente para que na consistência da polpa seja cerca de 1,0000g de polpa seca, foi desintegrada em 50 mL de água destilada até ficar livre dos grumos e dos feixes de fibras não dispersas. Em seguida a polpa foi transferida para um Erlenmeyer de 300 mL com lavagens sucessivas do recipiente com 50 mL de água destilada até volume de 200 mL.

Sob agitação constante, adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico 2 mol L⁻¹ e 25 mL de solução padronizada de permanganato de potássio (KMnO₄) 0,0200 mol L⁻¹ marcando-se imediatamente o tempo de 10 minutos com um cronômetro. Aos cinco minutos mede-se a

temperatura da reação e ao término de 10 minutos adicionou-se 5 mL de KI 1,0 mol L⁻¹ e titulou-se o iodo livre na suspensão com solução padronizada de tiossulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,0330 mol L⁻¹ até que a solução ficasse com uma tonalidade amarelo claro. Adicionou-se então, algumas gotas de solução de amido 1% e prosseguiu-se com a titulação até a viragem da cor de azul para branca. O teste em branco foi realizado pelo mesmo procedimento na ausência da polpa e todas as análises foram feitas em duplicata.

Para calcular o valor de número Kappa utilizou-se de um programa computacional baseado nas seguintes equações (valores de concentração estão estipulados em normalidade, de acordo com o método descrito na referência):

$$K = \frac{P \times f(p) \times f(t)}{W} \qquad P = \frac{(b-a) N}{0,1}$$

Onde,

$f(p)$ = fator de correção do consumo de permanganato a 50% , dependendo do valor de p.

$f(t)$ = fator de correção da temperatura.

W = peso em gramas da polpa seca

p = mililitros de KmnO₄ consumidos pela polpa

b = mililitros de tiossulfato consumidos pelo branco

a = mililitros de tiossulfato consumidos no ensaio

N = normalidade do tiossulfato

Determinação da Viscosidade:

Pesou-se exatamente 50 mg de polpa seca e colocou-se em um balão de destilação de 50 mL de duas bocas com bexiga e septo de borracha adaptados, adicionando-se em seguida 5 mL de água destilada. A mistura foi levada à agitação até formação de suspensão homogênea. A seguir foram adicionados 5 mL de solução de etilenodiamina cúprica, solução 0,5 molL⁻¹ em cobre, e o sistema foi purgado com nitrogênio. A mistura foi agitada durante 15 - 20 minutos e transferida para um viscosímetro Fenske-Ostwald, previamente aferido

com óleo padrão Cannon - ASTM certificado e utilizado dentro dos limites apropriados. O tempo de escoamento da solução foi cronometrado a 25°C e o cálculo da viscosidade em centipoises (cp) foi determinado pela equação:

$$V = K.t.d$$

Onde,

K = constante do viscosímetro (0,1670)

t = tempo de escoamento em segundos

d = densidade da solução de celulose a 25°C (1,052 gdm⁻³)

V = viscosidade da fibra de celulose em centipoises

Determinação da alvura:

A alvura foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro para medidas de reflectância a 457 nm, calibrado com folhas padrão recomendadas pelas normas vigentes, sendo os resultados expressos como percentuais relativos à alvura do óxido de magnésio (MgO), considerado 100.

III 2.2.6 Determinação de lignina solúvel : Aliquotas filtradas dos efluentes, resultantes da hidrólise das polpas, são diluídas apropriadamente em tampão fosfato pH 7,0 e a absorbância das soluções é lida em 215 nm e 280 nm. O diluente é utilizado para calibração do espectrofotômetro UV-VIS HITACHI U-2000 e a concentração de lignina é obtida pela equação $C_L = [(4,53A_{215} - A_{280}) / 300] \times D$ onde, C_L é a concentração de lignina expressa em mg L⁻¹, A_{215} e A_{280} são os valores de absorbância das soluções nos respectivos comprimentos de onda e D o valor da diluição da amostra. Todas as análises foram realizadas em duplicata (Goldschmidt, 1971).

III. 2.2.7 Determinação de açúcares redutores: utilizou-se o método de reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). Em 1,5 mL de aliquotas de efluente, filtrado em membrana “millipore” 0,45 µm, foram adicionados 3 mL de solução de DNS. A mistura foi aquecida durante 5 minutos em banho de água em ebulição, esfriada em banho de gelo e a

absorbância lida em 540 nm. Para as amostras de efluente foi utilizado xilose como padrão para a curva de calibração e todas determinações foram realizadas em duplicata.

III. 2.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): a fim de quantificar os principais açúcares das polpas estudadas (glicose e xilose neste caso), foram obtidos os cromatogramas da mistura glicose, xilose e celobiose em 6 concentrações distintas e determinadas as curvas de calibração para cada um. Os padrões foram dissolvidos na fase móvel composta de solução 0,01 M de H_2SO_4 . A cromatografia foi realizada em cromatógrafo KNAUER PUMP64, equipado com coluna para ácido orgânico AMINEX HPX-87H e detector por índice de refração KNAUER. A coluna foi mantida a 45°C e a velocidade do fluxo mantida em 0,6mL/min. O perfil dos cromatogramas obtidos pode ser visto no apêndice 1, anexado ao final da tese.

III. 2.2.9 Determinação do comprimento das fibras: o comprimento médio das fibras da polpa e o grau de “coarseness” foram determinados através da utilização do Medidor de Comprimento de fibras KAJAANI FS-200, seguindo metodologia TAPPI T 271.

III. 2.2.10 Conteúdo de metais: a presença de metais nas fibras das polpas foi determinada seguindo metodologia qualitativa de análise, através do Espectrômetro de Fluorescência de Raio-X de Energia Dispersiva - SPECTRACE 5000, equipado com lâmpada de ródio. Foram formadas folhas de polpas, através de filtração à vácuo, que depois de secas ao ar foram cortadas e submetidas à espectroscopia de fluorescência de raio-X de energia dispersiva. A tabela dos resultados pode ser vista no apêndice 2, anexado ao final da tese.

III. 3 Resultados e Discussão

III. 3.1 Caracterização do sistema hemicelulolítico de *Aspergillus sp* 2M1:

A composição do extrato enzimático bruto, obtido de culturas do fungo *Aspergillus sp* 2M1 induzido por três tipos distintos de fonte de carbono, está representada na tabela a seguir. A caracterização dos diferentes extratos enzimáticos tornou-se importante pois permite uma comparação do efeito combinado das enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana durante o branqueamento.

A princípio, a xilana de aveia foi o meio de cultura indutor mais eficiente, com ênfase para as atividades de xilanase, acetil-esterase e arabinofuranosidase, e a única fonte de carbono indutora de feruloil-esterase. Tais disparidades devem certamente estar ligadas à composição das xilanas utilizadas, já que tanto em bétula como eucalipto (xilanas de madeiras duras) os resíduos de arabinose são ausentes.

Tabela 3. Atividades enzimáticas de sistemas induzidos por diferentes xilanas.

	Bétula/ U L ⁻¹	Eucalipto/ U L ⁻¹	Aveia/ U L ⁻¹
β-Xilanase	33990	24580	65450
Mananase	121	119	173
β-Glicosidase	12	12	21
β-Xilosidase	40	35	47
Arabinosidase	4	4	22
α-Galactosidase	101	110	95
Acetil-Esterase 5min.	27360	24880	39040
Acetil-Esterase 10min.	21000	18680	31560
*Feruloil – Esterase	0	0	4
α-Glucuronidase	12	15	17
Exo e Endo - Celulase	0	0	0
Fpase	0	0	0

* Resultados determinados por Carolina Aguirre, Universidade de Concepción – Chile.

A xilana de eucalipto exibiu indução de um extrato enzimático com mesmo perfil daquele induzido por xilana de bétula comercial. Entretanto, em termos proporcionais à quantidade de xilanase, o extrato enzimático induzido por eucalipto apresentou um teor de α-glucuronidase e β-xilosidase mais elevado que os demais, o primeiro quase duas vezes o

encontrado na indução com xilana de bétula. É interessante salientar que os resultados apresentados demonstram que a composição do extrato enzimático pode ser adaptada conforme origem da polpa a ser branqueada.

O perfil de indução das três enzimas mais importantes para degradação de xilanas de polpas de eucalipto, β -xilanase, β -xilosidase e α -glucuronidase, pode ser visto nas Figuras 10 e 11.

III. 3.2 Análise das polpas submetidas ao branqueio XOP:

Durante o branqueamento XOP (xilanase/oxigênio/peróxido) de uma polpa kraft de eucalipto com os três diferentes extratos enzimáticos obtidos, foi observada redução do número kappa e proteção da viscosidade das fibras, principalmente durante o estágio X (tratamento com enzimas). O melhor desempenho dentro do processo foi apresentado pela polpa tratada com o extrato enzimático induzido por xilana de eucalipto (Tabela 4). É interessante notar que no tratamento das polpas pré-deslignificadas com oxigênio a aplicação de xilanas se mostrou pouco efetiva na redução do número kappa (Tabela 5). Também foi observado que em ambas sequências estudadas o extrato enzimático induzido por xilana de aveia, embora com maior expressão de outras enzimas do “pool” xilanolítico, não melhorou o desempenho das polpas durante o branqueamento.

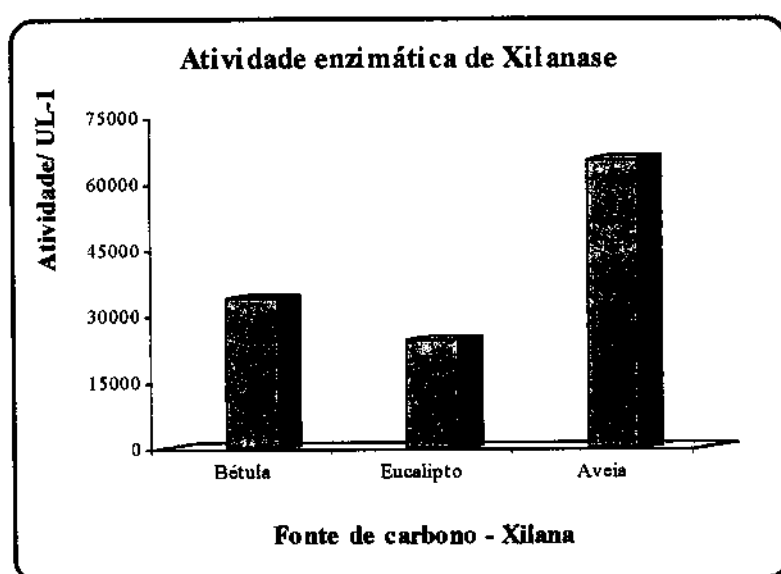


Figura 10. Atividade de β -xilanase em extratos enzimáticos de *Aspergillus sp* 2M1.

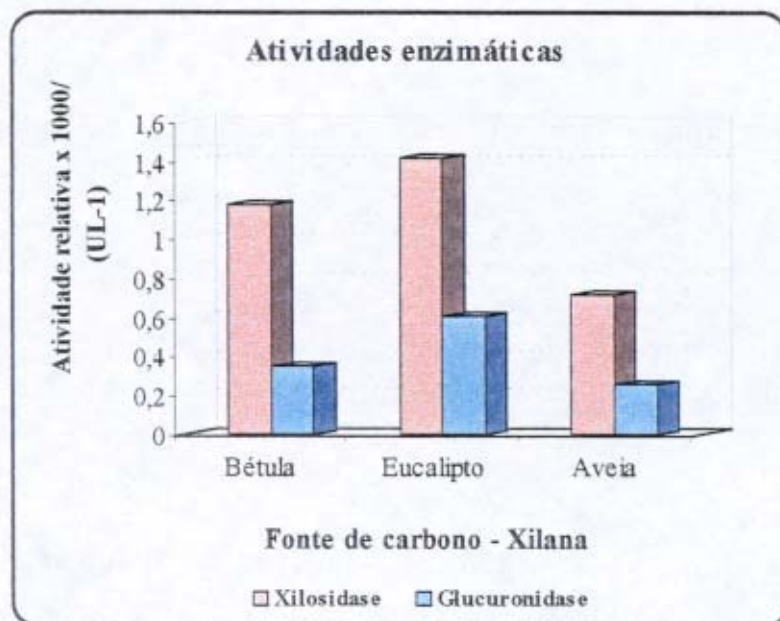


Figura 11. Atividades relativas de β -xilosidase e α -glucuronidase em extrato enzimático de *Aspergillus sp* 2M1.

As diferenças encontradas no branqueamento XOP de polpas kraft de eucalipto podem estar relacionadas à atividade de glucuronidase. Isto porque, no caso das madeiras duras, as cadeias de xilana mostram-se substituídas, por grupos de ácido 4-O-metilglucurônico (através de ligações do tipo α -1,2- com o anel glicosídico da xilose). No caso da hemicelulose de eucalipto, comparadas à glucuranoxilana, as porções de glucomanana, galactanas ou arabinofuranoxilanas têm menor importância. Desse modo, as respectivas enzimas responsáveis pela degradação destes polissacarídeos não devem ser significantes na hidrólise deste tipo de hemicelulose. A atuação da acetil-esterase neste caso também é muito limitada, pois os grupos acetila são substituídos por grupos hidroxila durante a polpação alcalina. Por último, ao contrário de madeiras moles, a literatura reporta não ser usual que a xilana de eucalipto possua derivados ferúlicos como substituintes, tornando a feruloil esterase irrelevante para o processo de hidrólise enzimática da polpa. Portanto, as polpas utilizadas neste ensaio, quando tratadas com extrato enzimático induzido por xilana de eucalipto, apresentaram um melhor desempenho dentro do processo, indicando que um

possível efeito cooperativo entre β -xilanases e α -glucuronidases durante hidrólise da xilana seja responsável por tal efeito.

Tabela 4. Valores de Kappa e Viscosidade de polpas sem pré-deslignificação com O₂.

	Estágio X		Estágio OP	
	Kappa	Viscosidade/cp	Kappa	Viscosidade/cp
Controle	12,9	36,6	7,9	15,6
Bétula*	11,6	40,9	6,7	16,0
Eucalipto*	10,5	40,6	7,1	14,7
Aveia*	10,9	40,2	7,2	14,7

* pool enzimático induzido pelas respectivas xilanas.

Tabela 5. Valores de Kappa e Viscosidade de polpas pré-deslignificadas com O₂.

	Estágio X		Estágio OP	
	Kappa	Viscosidade/cp	Kappa	Viscosidade/cp
Controle	9,9	30,6	7,2	16,1
Bétula*	9,9	30,9	6,9	15,5
Eucalipto*	9,5	33,0	6,5	15,6
Aveia*	9,7	33,6	6,9	15,9

* pool enzimático induzido pelas respectivas xilanas.

III. 3. 3 Análise das polpas submetidas ao branqueio XZP:

Os resultados apresentados a seguir referem-se a uma sequência de branqueamento totalmente livre de cloro aplicada em amostras de polpas kraft de eucalipto não submetidas à pré-deslignificação com oxigênio. A sequência escolhida baseou-se em um pré-tratamento enzimático com xilanases (X) seguido de dois estágios oxidativos com ozônio (Z) e peróxido de hidrogênio (P) respectivamente. No estágio de tratamento enzimático o tempo de incubação, a fonte de carbono indutora de enzima, temperatura e carga enzimática aplicada sobre a polpa foram variados, fornecendo 15 diferentes amostras, que foram então submetidas às duas etapas seguintes.

Nas tabelas 6 e 7, e nas figuras 12 e 13 estão apresentados todos os resultados obtidos para a caracterização das polpas submetidas à sequência XZP e seus efluentes. De um modo geral o desempenho das polpas tratadas com xilanase foi superior (ou equivalente) ao das

amostras controle, independente da natureza da fonte de carbono indutora (bétula ou eucalipto) ou da carga de enzima adicionada. Nos estágios X e Z as polpas enzimaticamente tratadas apresentaram maior eficiência de deslignificação com a vantagem de proteger a viscosidade das fibras.

Tabela 6. Caracterização de polpas de eucalipto submetidas ao branqueamento XZP.

Condições*	Estágio X		Estágio Z		Estágio P	
X : 50°C e 90 min.	K	V	K	V	K	V
Controle	14,1	27,6	12,1	11,2	7,6	10,5
Xil. bétula 4U/g	12,9	24,8	10,3	11,7	6,4	10,3
Xil. eucalipto 4U/g	12,9	27,8	9,1	12,0	6,1	10,0
Xil. bétula 10U/g	12,8	26,4	9,4	11,7	6,1	10,5
Xil. eucalipto 10U/g	12,6	24,8	9,1	12,8	6,0	10,6
X : 50°C e 180 min.	K	V	K	V	K	V
Controle	13,1	25,9	12,8	10,0	6,9	9,7
Xil. bétula 4U/g	12,9	26,1	9,5	10,8	6,1	10,7
Xil. eucalipto 4U/g	12,8	27,2	8,4	11,2	5,1	9,3
Xil. bétula 10U/g	12,8	26,8	9,0	11,6	5,8	9,9
Xil. eucalipto 10U/g	12,9	29,7	10,1	12,3	6,2	10,9
X : 40°C e 12 h.	K	V	K	V	K	V
Controle	13,6	28,3	9,5	10,9	6,3	9,0
Xil. bétula 4U/g	12,9	26,5	9,0	13,3	5,5	10,5
Xil. eucalipto 4U/g	12,2	30,7	8,0	11,1	5,2	9,9
Xil. bétula 10U/g	12,2	29,0	7,6	10,2	4,9	9,7
Xil. eucalipto 10U/g	12,2	29,3	8,5	10,8	4,6	9,7

* condições do estágio X da sequência de branqueamento e condições de indução do extrato enzimático. K = número kappa (1,3%); V = viscosidade/ cp (2,2-3,0%). Valores entre parênteses correspondem aos desvios médios encontrados para cada método.

A redução da viscosidade das polpas foi indiscriminada e se deu principalmente no estágio de deslignificação com ozônio. Os índices de lignina solúvel e açúcares redutores dos efluentes (tabela 7), mais especificamente no estágio Z, foram condizentes com os resultados, e atestaram que o efeito benéfico do tratamento enzimático vai além do estágio inicial de incubação com xilanase. Em alguns casos, as polpas tratadas com xilanases e induzidas por xilana de eucalipto apresentaram maior redução do número kappa, liberando também maior quantidade de lignina solúvel nos efluentes.

As figuras 12 e 13 apresentam os resultados dos percentuais de glicose e xilose das polpas após hidrólise ácida. Em todos os casos observou-se um decréscimo no teor de xilose das polpas por ação da enzima, com manutenção dos níveis de glicose. A extensão da hidrólise não foi maior para as polpas tratadas com enzima a 40°C e 12 h, e os resultados obtidos para este caso não apresentaram uma diferença muito marcante entre as polpas enzimaticamente tratadas e a polpa controle. Apesar disto, esta sequência apresentou redução significativa no índice de número kappa nos estágios posteriores ao tratamento enzimático. Uma análise mais detalhada dos resultados de cada sequência de branqueamento será realizada a seguir.

Tabela 7. Lignina solúvel e Açúcares redutores dos efluentes - Sequência XZP.

Condições*	Estágio Z		Estágio P	
	L	A	L	A
X : 50°C e 90 min.				
Controle	117	150	286	120
Xil. bétula 4U/g	140	50	273	50
Xil. eucalipto 4U/g	171	60	252	330
Xil. bétula 10U/g	144	50	273	20
Xil. eucalipto10U/g	154	70	273	50
X : 50°C e 180 min.				
Controle	106	40	414	170
Xil. bétula 4U/g	149	50	273	570
Xil. eucalipto 4U/g	192	60	317	810
Xil. bétula 10U/g	168	60	246	150
Xil. eucalipto10U/g	124	50	311	140
X : 40°C e 12 h.				
Controle	128	40	429	310
Xil. bétula 4U/g	162	60	271	310
Xil. eucalipto 4U/g	183	70	257	50
Xil. bétula 10U/g	184	50	272	940
Xil. eucalipto10U/g	154	60	246	70

* condições do estágio X da sequência de branqueamento e condições de indução de xilanases. L=lignina solúvel/ mgL^{-1} (1,3-2,1%); A=açúcares redutores/ mgL^{-1} (0,6-2,2%). Valores entre parênteses correspondem aos desvios médios encontrados para cada método.

Os resultados referentes à sequência de branqueamento XZP com estágio X a 50°C e 90 minutos foram dispostos em forma de gráficos para facilitar sua análise. Foi possível verificar uma certa vantagem na utilização do extrato enzimático induzido por xilana de eucalipto: nos dois estágios subsequentes ao pré-tratamento com xilanase os menores índices de número kappa foram atingidos com as enzimas induzidas neste meio (Tabela 6 e Figura 14). De um modo geral, em todo o processo a viscosidade das polpas controle e das polpas enzimaticamente tratadas foram similares, com uma pequena melhora neste índice por parte das amostras submetidas ao tratamento com xilanase durante o estágio de deslignificação com ozônio (Tabela 6 e Figura 15).

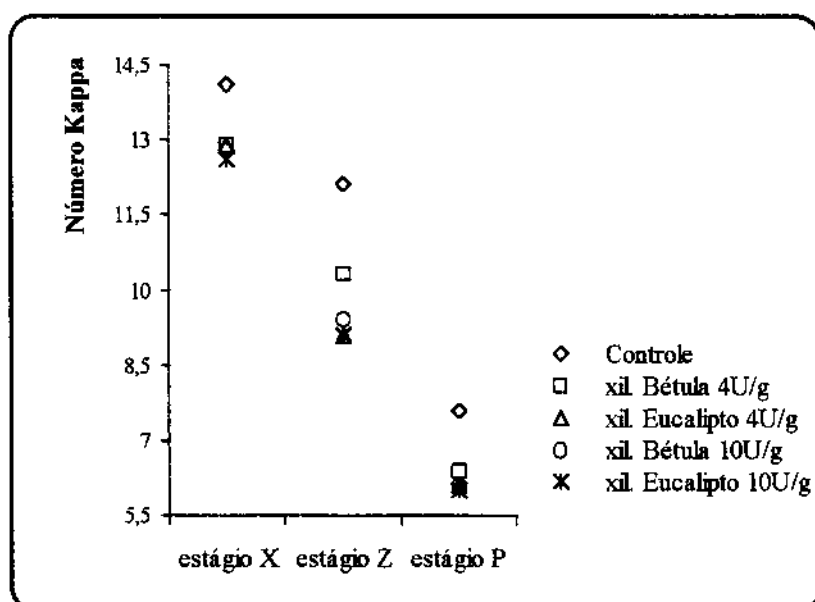


Figura 14. Determinação do Número Kappa de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 90min.

Na determinação do teor de lignina solúvel dos efluentes foram observados, durante o estágio Z, índices mais elevados por parte das polpas tratadas com xilanases (com ênfase para a polpa tratada com xilanase induzida por xilana de eucalipto). O aumento no teor de lignina solúvel determinada nos efluentes acompanhou o perfil da redução do número kappa, sendo que a quantidade de açúcares, apesar de variável, foi mínima (como poderá ser confirmado posteriormente) (Tabela 7 e Figura 16). É interessante notar, que nos dois estágios analisados (Z e P), os maiores teores de açúcares redutores encontrados

corresponderam aos menores valores de viscosidade. Entretanto, este comportamento não foi o mesmo para as demais sequências (Figura 17).

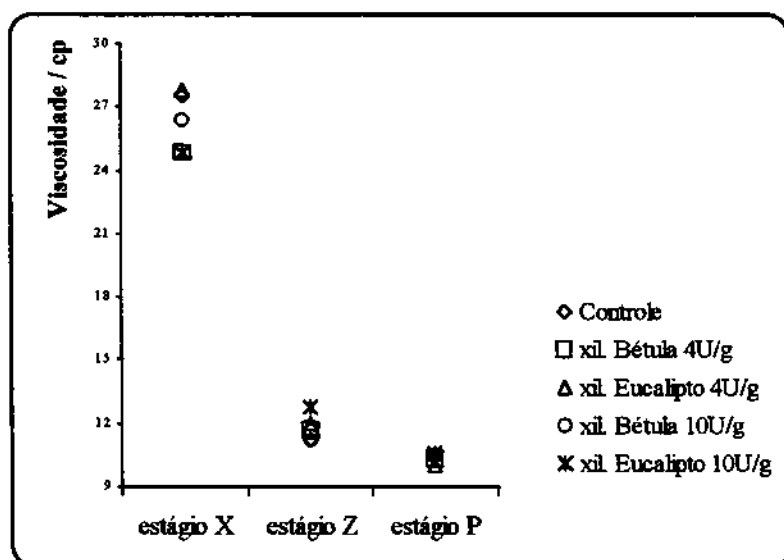


Figura 15. Determinação da viscosidade de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 90min.

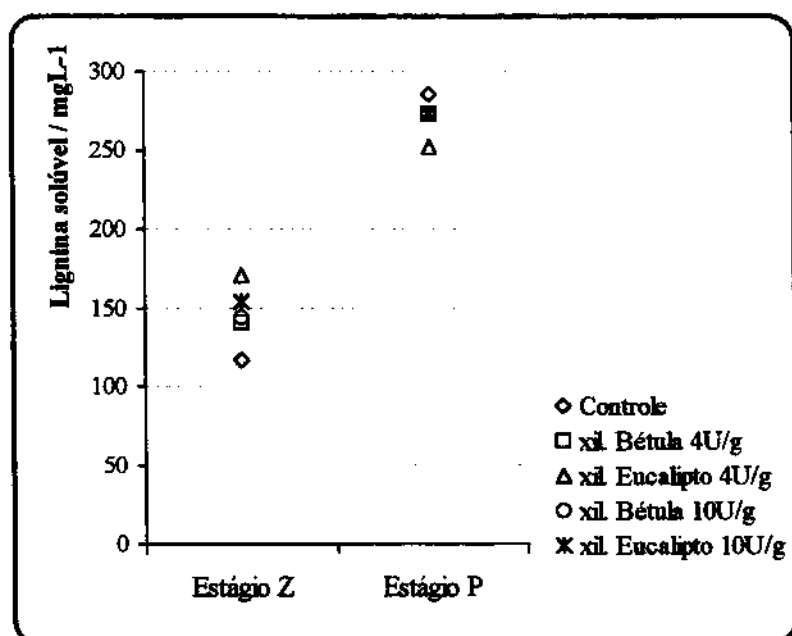


Figura 16. Determinação de lignina solúvel nos efluentes. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 90min.

Em resumo, o tratamento enzimático melhorou o desempenho das polpas, pelos parâmetros estudados, não só no estágio X, como persistiu ao longo da sequência de branqueamento.

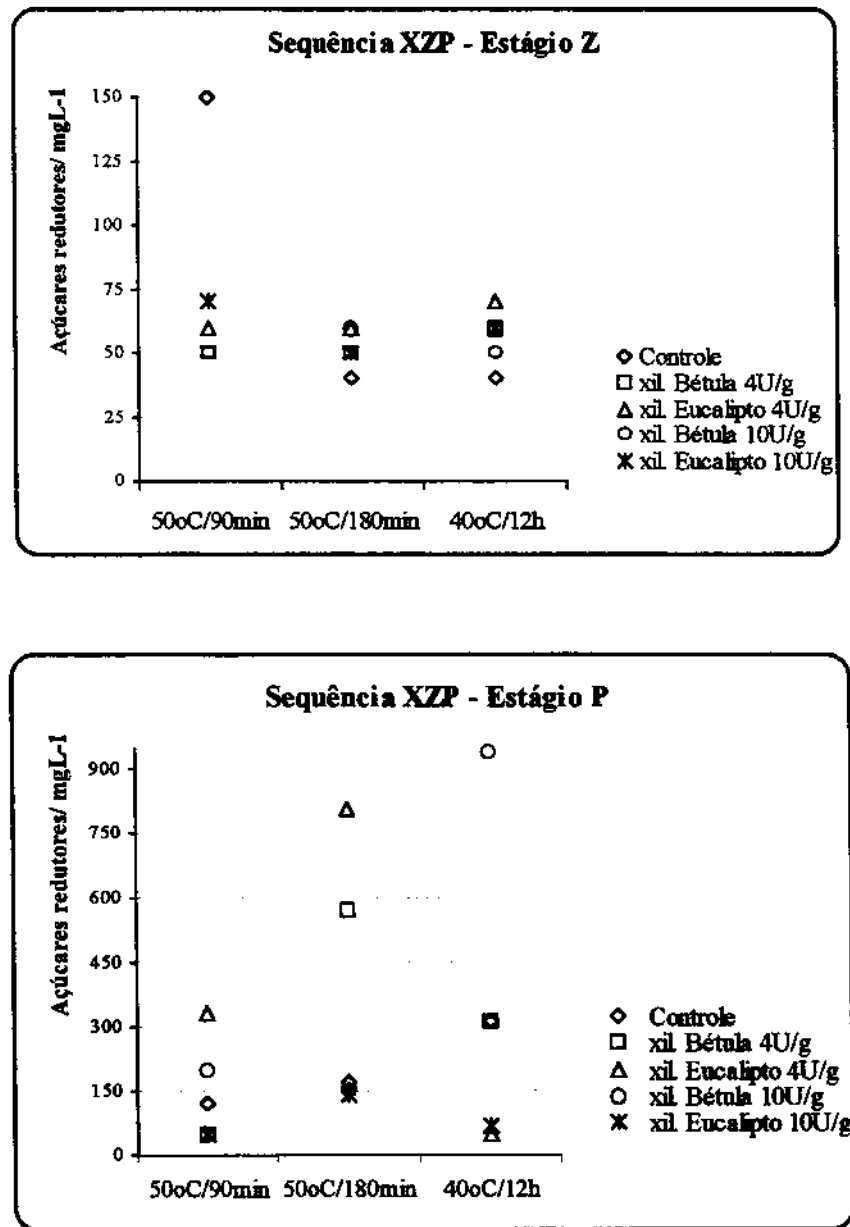


Figura 17. Determinação do teor de açúcares redutores nos efluentes.

Os resultados apresentados na Tabela 6 e Figuras 18 e 19 indicaram que o aumento do tempo de incubação a 50°C não intensifica os efeitos do tratamento enzimático, já que o

perfil das polpas caracterizadas foi muito semelhante ao observado para o mesmo tratamento durante 90 minutos.

Aparentemente o aumento no tempo de incubação no estágio X teve mais influência na redução do número kappa final do processo em si do que na atuação da enzima, já que os parâmetros analisados apresentaram a amostra controle desta sequência com número kappa final menor em relação à anterior. Novamente, constatou-se um melhor desempenho das polpas tratadas com extrato enzimático induzido em xilana de eucalipto quando comparadas às demais. Uma ligeira melhora foi observada em relação à sequência de branqueamento anterior: no estágio de deslignificação com ozônio a redução do número kappa pelo tratamento enzimático alcançou o valor máximo de 4,4 unidades contra 3,0 unidades no branqueamento de 90 minutos, sem perda na viscosidade .

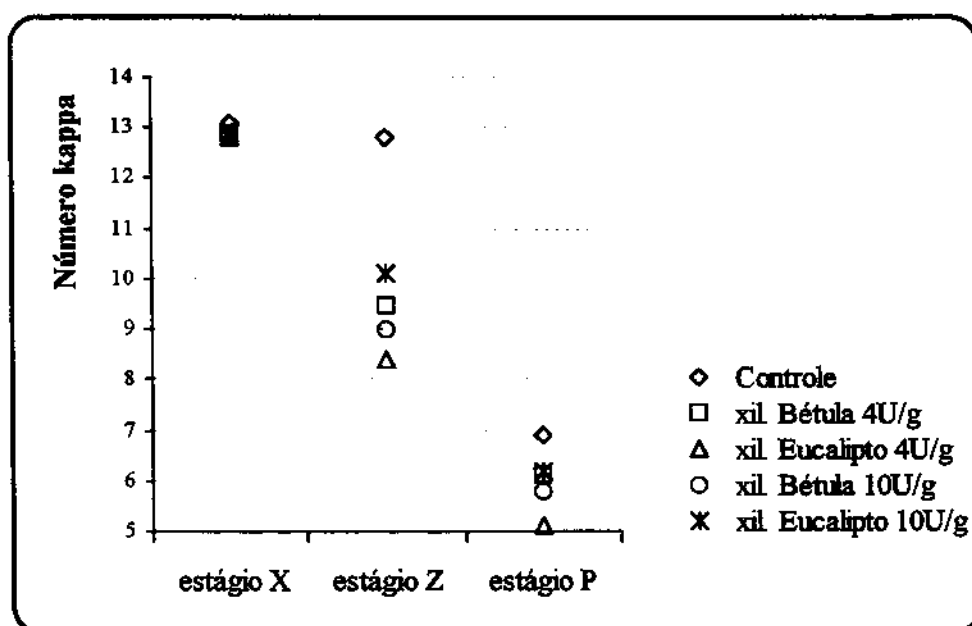


Figura 18. Determinação do Número Kappa de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 180min.

Através das análises dos efluentes, verificou-se que o comportamento das polpas foi muito semelhante àquele anteriormente avaliado. Apenas no estágio de deslignificação com peróxido observou-se um ligeiro aumento na lignina solúvel e no teor de açúcares dos efluentes, se comparados à sequência anterior (Tabela 7; Figuras 17 e 20). O aumento da

lignina solúvel pôde ser relacionado à redução dos índices kappa, mas o aumento do teor de açúcares apresentado por alguns efluentes não teve correlação com nenhum parâmetro.

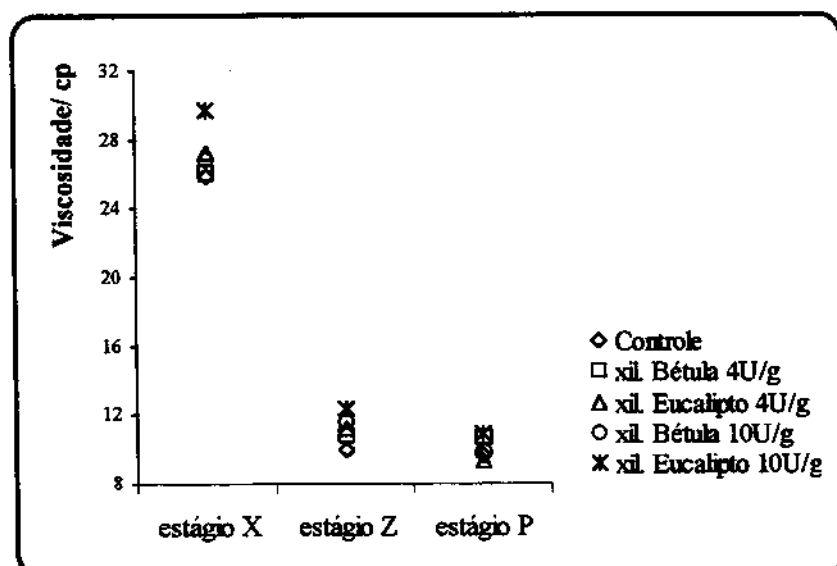


Figura 19. Determinação da Viscosidade de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 50°C e 180min.

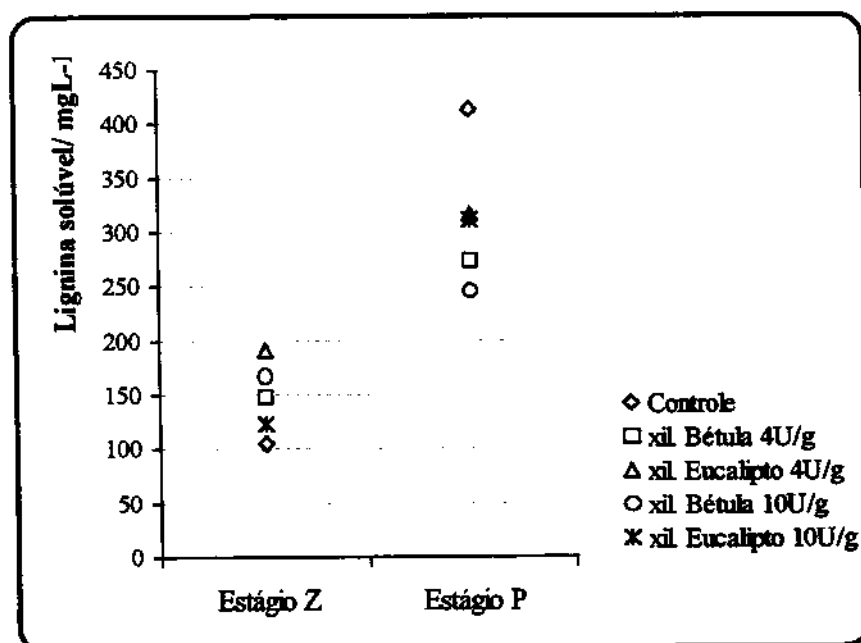


Figura 20. Determinação de lignina solúvel nos efluentes. Sequência de branqueamento com estágio enzimático a 50°C e 180min.

Como pode ser visto nas figuras 21, 22 e 23, a aplicação de xilanases sobre as polpas durante um tempo prolongado (12h) e a uma temperatura adequada para a hidrólise enzimática não causou maior extensão na degradação da xilana (vide figura 13) nem alterações significativas nos resultados do branqueamento. Ao final do processo, os índices dos números kappa foram os menores encontrados dentre todas as sequências, mas também foi o branqueamento que apresentou menor benefício do uso das enzimas. O efeito das xilanases parece que não foi dependente do tempo de hidrólise, sendo ao contrário, minimizado.

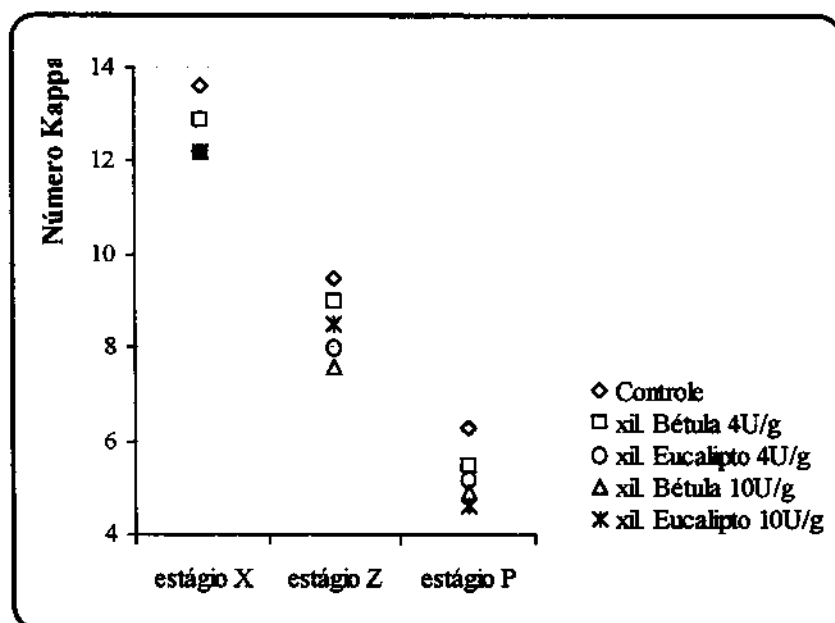


Figura 21. Determinação do Número Kappa de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 40°C e 12 h.

Efeito da pré-deslignificação com O₂ sobre polpas de eucalipto submetidas ao branqueamento xilanase-ozônio-peróxido:

As Tabelas 8 e 9 apresentam os resultados obtidos durante o branqueio de uma polpa de eucalipto pré-deslignificada com O₂ e submetida a uma sequência de branqueamento idêntica à ilustrada na Tabela 2. A escolha dos parâmetros envolvidos baseou-se na eficiência e facilidade prática das sequências estudadas, a fim de que fosse permitida a

comparação dos resultados encontrados com aqueles já obtidos para polpas sem pré-deslignificação com oxigênio.

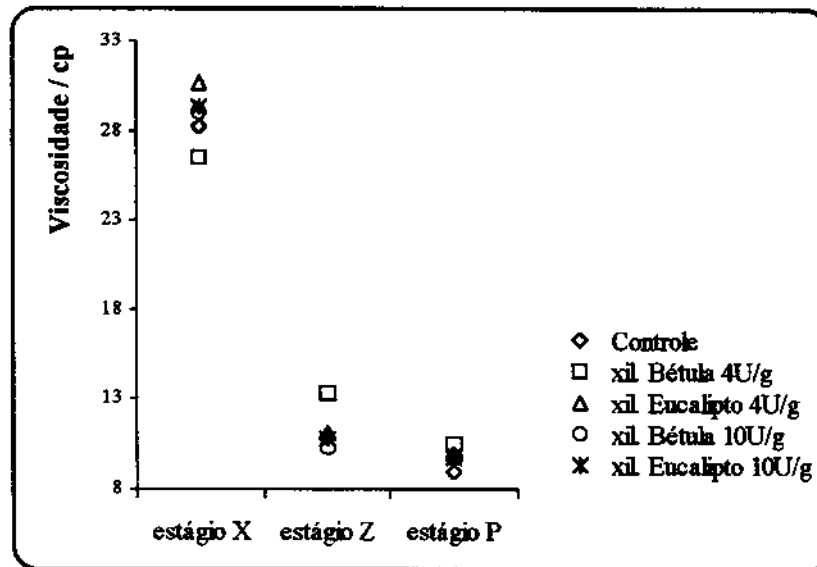


Figura 22. Determinação da Viscosidade de polpas kraft de eucalipto. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 40°C e 12 h.

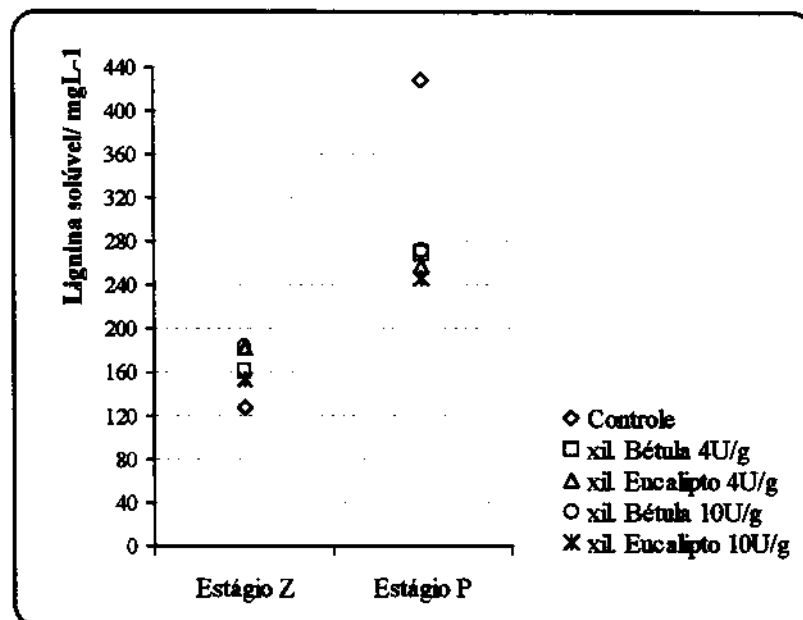


Figura 23. Determinação de lignina solúvel nos efluentes. Sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático a 40°C e 12 h.

Tabela 8. Caracterização das polpas kraft submetidas ao branqueamento (O)XZP.

	K	A / % ISO	V / cp	L /mg L ⁻¹	A _R / mg L ⁻¹
Estágio X					
Controle	9,7	56,3	23,9	43	100
Xil. bétula 4U/g	9,7	61,2	25,0	177	4600
Xil. bétula 10U/g	9,7	61,0	27,0	209	6800
Estágio Z					
Controle	2,9	71,7	13,4	112	1600
Xil. bétula 4U/g	1,0	79,9	9,2	92	600
Xil. bétula 10U/g	1,1	81,7	9,0	79	900
Estágio P					
Controle	1,6	76,9	12,4	203	600
Xil. bétula 4U/g	0,6	84,3	7,8	159	800
Xil. bétula 10U/g	0,5	83,8	8,1	146	600

K= número kappa (2,0%) ; V= viscosidade/cp (2,5%); L= lignina solúvel do efluente (1,8%); A_R= Açúcares redutores do efluente (1,2%), A= alvura / %ISO. (O)XZP= branqueamento xilanase/ozônio/peróxido com polpa pré-deslignificada com oxigênio ((O)). Entre parênteses: desvios médios encontrados para cada ensaio.

Através da comparação dos dois branqueamentos nas mesmas condições (tipo de enzima, temperatura e tempo de incubação), pôde-se verificar que a pré-deslignificação aumenta muito a seletividade, expressa como [% redução número kappa/ % redução da viscosidade] (Figura 24.) Isto porque, na sequência aplicada às polpas pré-deslignificadas com O₂, a redução expressiva do número kappa em relação às polpas sem pré-oxidação com O₂ compensa a queda na viscosidade observada em todos os estágios. A pré-deslignificação não somente forneceu uma polpa com menos lignina, como pareceu facilitar a extração desta lignina residual e aumentar o efeito do tratamento com xilanases.

A atuação da enzima sobre a hemicelulose da polpa de eucalipto pode ser vista pela redução do percentual de xilose (percentual relativo à massa total, em gramas, de amostra utilizada para cada hidrólise ácida) das polpas tratadas com enzima sem afetar o conteúdo de glicose (Tabela 9). A hidrólise enzimática da xilana é ainda confirmada pelo grande aumento do teor de açúcares apresentado pelos efluentes após aplicação de xilanase (Tabela 8) e pelo aumento do percentual relativo de glicose na polpa (Tabela 9), à medida que a sequência de branqueamento vai avançando.

Aparentemente não há grande diferença entre as duas polpas tratadas com diferentes cargas de xilanase. Provavelmente, a degradação da xilana é proporcional à carga de enzima

aplicada até um certo limite, a partir do qual o aumento da quantidade de xilanase não implica obrigatoriamente numa melhora equivalente no processo de deslignificação da polpa.

Tabela 9. Composição de açúcares das polpas kraft submetidas à sequência (O)XZP.

	GLICOSE / %	XILOSE / %
Estágio X		
Controle	91	7
Xil. bétula 4U/g	91	5
Xil. bétula 10U/g	91	4
Estágio Z		
Controle	85	7
Xil. bétula 4U/g	95	5
Xil. bétula 10U/g	93	4
Estágio P		
Controle	80	6
Xil. bétula 4U/g	94	3
Xil. bétula 10U/g	96	4

(O)XZP= branqueamento xilanase/ozônio/peróxido com polpa pré-deslignificada com oxigênio ((O)).

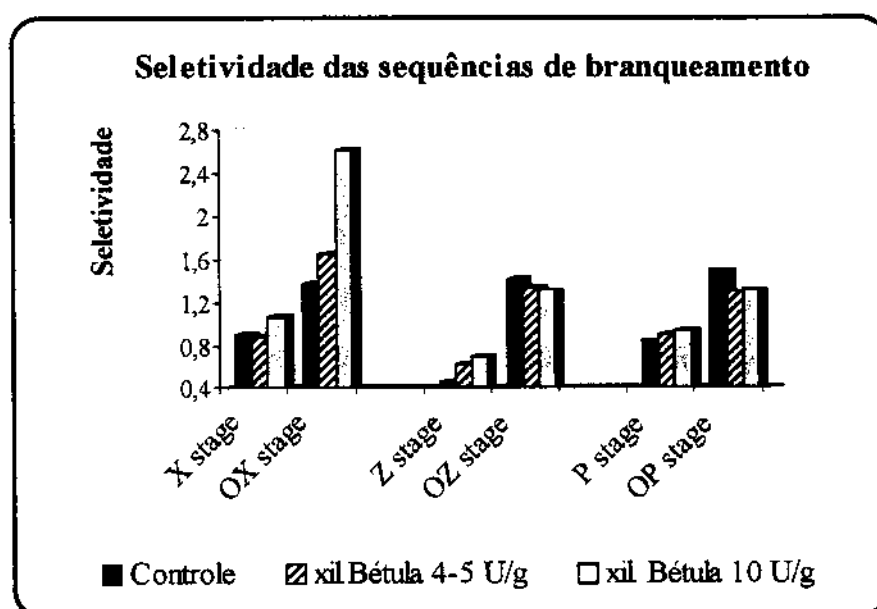


Figura 24. Comparação entre as seletividades dos processos de branqueamento com e sem Pré-deslignificação com oxigênio. Condições do estágio X: 50°C e 90 minutos.

O efeito do pré-tratamento enzimático também pode ser notado nos parâmetros relativos à deslignificação. Observa-se redução do número kappa nas etapas subsequentes ao tratamento com xilanase e o conteúdo de lignina dos efluentes é cerca de 80 % maior nas amostras X, bétula e X. eucalipto. Além disso, apesar de uma grande liberação de lignina antes do branqueamento com ozônio e peróxido, os níveis de lignina dos efluentes continuam em um patamar elevado nos estágios posteriores. O aumento significativo nos índices de alvura confirmam as observações acima, sendo notável a diferença encontrada para estes valores durante o estágio X (Tabela 8). Aliás, o aumento significativo da alvura juntamente com maior quantidade de lignina solúvel e açúcares nos efluentes do estágio X foram indicativos precisos de que, neste caso, houve uma atuação direta da enzima no branqueamento.

O efeito da pré-deslignificação com oxigênio em sequências de branqueamento ECF e TCF que utilizam uma etapa enzimática com xilanase tem sido investigado e os resultados mostram que esta combinação tende a facilitar a deslignificação nas etapas posteriores, ajudando ainda na manutenção da qualidade final da fibra de celulose (Furhmann e col., 1996; Nelson e col., 1996). As diferenças comportamentais de polpas pré-deslignificadas com oxigênio durante sequências de branqueamento, principalmente no que diz respeito ao uso de enzimas hemicelulolíticas, muito provavelmente está ligada às alterações sofridas pelos grupos cromóforos durante a oxidação. Numa investigação das reações de condensação da lignina residual durante a deslignificação com oxigênio, por exemplo, foi observado que esta condensação é dependente do meio reacional empregado (Evtuguin e col., 1996).

Após obtenção e avaliação das análises químicas realizadas para a sequência de branqueamento da polpa de eucalipto pré-deslignificada com oxigênio – (O)XZP decidiu-se realizar análises para obtenção do comprimento médio das fibras e seu grau de “coarseness” (mg de polpa/m – relacionada com possível degradação da parede celular das fibras) e também uma avaliação do conteúdo de metais.

Sabe-se que a presença de metais como Fe^{2+} tem um papel importante na degradação da fibra de celulose durante processos de deslignificação com ozônio e peróxido, com redução da viscosidade e propriedades físicas. Como foi verificado um decréscimo maior na

viscosidade das polpas enzimaticamente tratadas optou-se por realizar um estudo da composição de metais. A análise da composição de metais, embora superficial, apresentou um perfil bastante homogêneo para todas as amostras, com os elementos Ca, Fe, Cu, Ni e Zn sendo detectados em todos os casos. A diferença mais marcante foi encontrada na análise das amostras do estágio X, onde o conteúdo de Cu foi mais expressivo que o respectivo conteúdo presente na amostra controle (figura 25). Entretanto, a redução da viscosidade não pode ser atribuída a esta observação visto que o efeito da presença de metais só seria justificável nos estágios oxidativos com ozônio ou peróxido de hidrogênio.

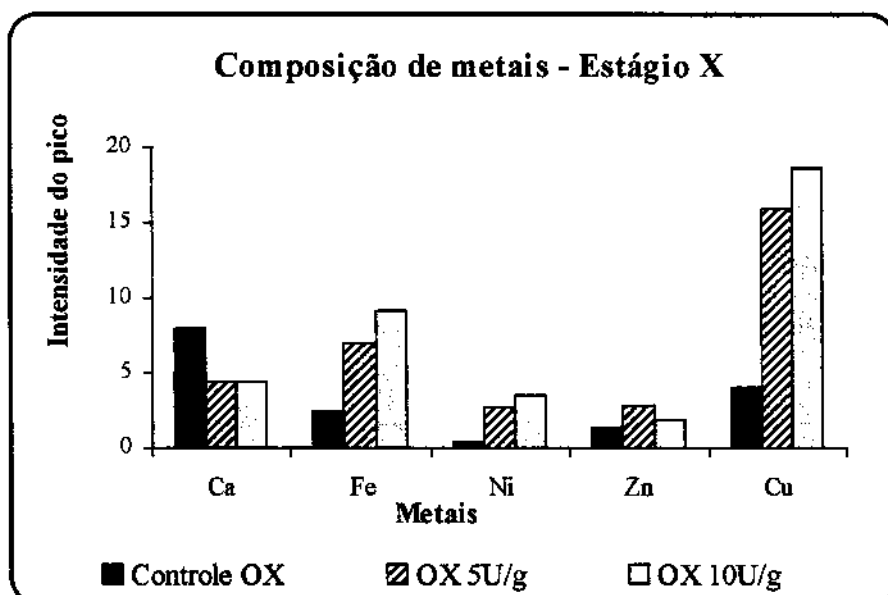


Figura 25. Determinação de metais. Branqueamento (O)XZP.

Os resultados das determinações do comprimento médio das fibras (comprimento médio = 0,74 mm) ou “coarseness” (0,076 mg/m) foram muito similares durante todo o processo, independente do tratamento enzimático. Os resultados indicaram que a perda maior de viscosidade pelo processo (O)XZP pode não estar somente ligada à degradação dos carboidratos, mas também a alterações estruturais da polpa. Entretanto, um estudo mais profundo, com determinações das propriedades físicas das polpas, seria necessário para uma afirmação mais contundente (figuras 26 e 27).

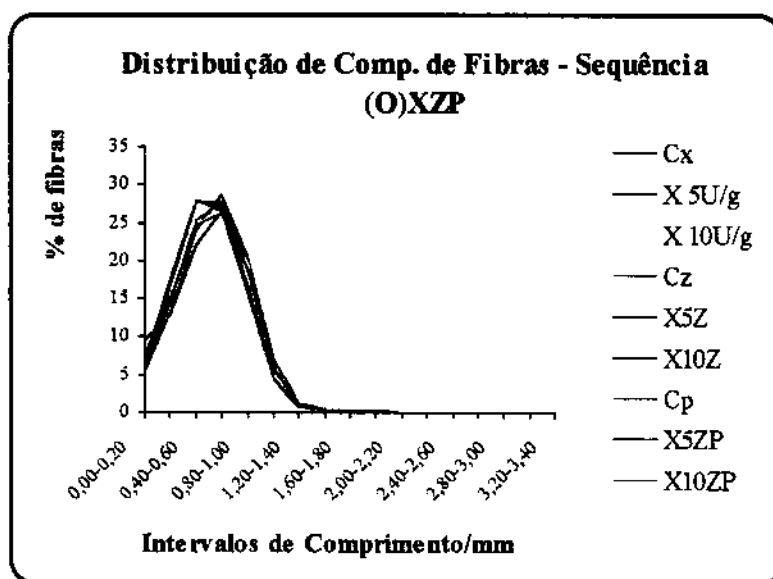


Figura 26. Distribuição do comprimento médio das fibras das polpas analisadas.

Cx, Cz, Cp= amostras controle dos estágios X, Z e P; X, XZ e XZP= amostras enzimaticamente tratadas relativas aos estágios X, Z e P; 5 e 10 U/g = carga de enzima adicionada no estágio X.

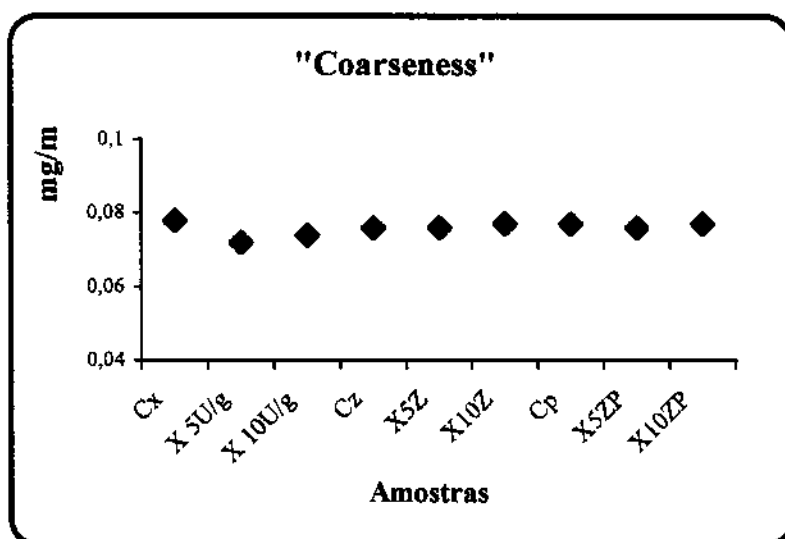


Figura 27. Determinação de "coarseness" das fibras de polpas kraft de eucalipto.

III. 4 Conclusões

Com base nos resultados obtidos pôde-se concluir:

✎ A composição de enzimas do extrato hemicelulolítico de *Aspergillus* sp 2M1 não se alterou em consequência da indução por diferentes fontes de carbono, no caso, xilanas. Entretanto, apesar da composição similar, a proporção de algumas enzimas variou nos extratos estudados, principalmente aquelas relacionadas à hidrólise dos grupos substituintes laterais à cadeia principal (neste caso ressalta-se a α -glucuronidase). A degradação enzimática da hemicelulose pode portanto, ser melhor adaptada a cada tipo de polpa.

✎ A indução de um extrato xilanolítico por xilana de mesma origem que a polpa de celulose a ser branqueada deve levar, principalmente se otimizado, a um favorecimento do processo de branqueamento, seja a nível do estágio de hidrólise enzimática quanto aos estágios oxidativos subsequentes.

✎ A extensão da hidrólise enzimática é um fator decisivo para o aumento da branqueabilidade da polpa. Entretanto, o tempo de incubação (em temperatura que permita atividade enzimática) da polpa com a enzima exerce pouca influência neste parâmetro. Assim, a hidrólise enzimática se mostrou mais dependente da própria acessibilidade física das fibras do que das características cinéticas das enzimas.

✎ As análises realizadas neste trabalho mostraram em conjunto o efeito de aumento na branqueabilidade das polpas de celulose após aplicação de xilanases. A correlação entre a degradação de parte da xilana mais exposta com o aumento de fatores como alvura, lignina solúvel e açúcares redutores dos efluentes ou redução nos índices de número kappa, percentual de xilose ou até mesmo de viscosidade das fibras foi bastante visível. Apesar disto, não deve ser excluída a possibilidade de que as polpas tenham sua estrutura duramente afetada em consequência de alterações estruturais de grupos cromóforos e/ou físicas das fibras, graças à exposição aos reagentes empregados em sequências TCF do tipo (O)ZP.

CAPÍTULO IV

***Estudo sobre caracterização de polpas kraft de
Eucalyptus grandis através da utilização de técnicas de
análise química de superfícies.***

IV.1 Introdução

Paralelamente aos trabalhos de otimização de sequências de branqueamento com aplicação de xilanases, bem como de investigação de seu mecanismo de ação, diversos outros trabalhos vêm se ocupando em caracterizar e quantificar os polímeros da madeira em amostras de madeiras e polpas de celulose, com especial atenção para a química da superfície (Suurnakki e col., 1996d.; Buchert e col., 1996).

Nos últimos anos uma gama variada de técnicas, algumas já há muito utilizadas pela indústria de polpa e papel, vêm sendo empregadas como ferramentas na determinação de alterações provocadas na composição e na morfologia da superfície de madeiras, ligninas e de polpas de celulose durante os vários processos de branqueio, com ou sem a utilização de uma etapa enzimática. Como exemplos pode-se citar algumas destas técnicas que foram tratadas neste trabalho: microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de força atômica (MFA), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e no infravermelho próximo (FTNIR), espectroscopia fotoeletrônica de raio-X (XPS) e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ^1H /RMN ^{13}C) entre outras. Algumas dessas técnicas, como MFA e XPS, apesar de bastante aplicadas em estudos de caracterização de diversos materiais, há pouco tempo começaram a ser aplicadas em estudos envolvendo branqueamento de polpas kraft.

Os estudos realizados nesta parte do trabalho tiveram por objetivo uma caracterização adicional das polpas de celulose obtidas anteriormente, a fim de permitir um maior esclarecimento sobre a ação das enzimas ao longo do processo. Para tanto, inicialmente todo um conjunto de técnicas selecionadas foram testadas, sendo posteriormente dedicado um maior enfoque àquelas que apresentaram maior conteúdo de informações. Entretanto, dentro de um contexto tão abrangente como o aqui apresentado não se esperou atingir um alto grau de profundidade para cada caso em particular, mas sim abrir novos caminhos para a caracterização de polpas de celulose.

Os próximos itens abaixo apresentam um breve resumo de algumas das técnicas mais empregadas atualmente na caracterização da superfície de materiais lignocelulósicos.

IV.1.1 Microscopias Eletrônicas de Varredura e Transmissão.

A utilização de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) na caracterização de madeiras e materiais lignocelulósicos não é um fato novo dentro da área. Ambas as técnicas, principalmente MET, concentraram-se basicamente em estudos de degradação e biodegradação de madeiras, com um crescimento atual em estudos com polpa de celulose (Paszner e Behera, 1989; Barrasa e col., 1992; Castro e Silva e col., 1993; Blanchette e col., 1994). Os estudos com enfoque na caracterização de polpas de celulose geralmente utilizam mais os resultados obtidos através de MEV (Hanley e col., 1992; Hortling e col., 1994; Suurnakki e col., 1994), cuja metodologia já é bem consolidada (Silveira e col., 1995).

A microscopia eletrônica de varredura permite uma caracterização morfológica da superfície das polpas, e em grande parte, a visualização da parede das fibras e das fibrilas, bem como sua textura são os fatos mais reportados. Um estudo com polpas de madeiras duras mostrou que a superfície das fibras foi aparentemente enrugada na direção longitudinal, como se a hemicelulose tivesse sido extraída, após ação de xilanases seguida de extração alcalina. As fibras não apresentaram nenhuma quebra que pudesse afetar sua resistência mecânica. No caso de polpas de madeiras moles foi observado um decréscimo no enrugamento das fibras após o tratamento com xylanases e uma distensão das mesmas após a extração alcalina (Pekarovicova e col., 1992). Roncero e col. (1998), apresentaram trabalho com xilanases aplicadas em sequência TCF de polpa de eucalipto. Foram observadas alterações morfológicas na superfície das fibras, que foram relacionadas com a ação da enzima.

Lan Pham e col. (1995), em análise das propriedades físicas de polpas kraft de eucalipto submetidas a um branqueamento XZP, observaram mudanças no perfil da superfície das fibras no decorrer do processo. O efeito mais comum atribuído à hidrólise da xilana é o de um certo “lixiviamento”, com remoção de parte das fibrilas presentes junto às fibras. Mansfield e col. (1997) verificaram alterações qualitativas ao redor das fibras de polpas kraft Douglas-fir enzimaticamente tratadas. Entretanto, o trabalho enfatiza que não foram encontradas diferenças marcantes entre as superfícies propriamente ditas, como clivagens ou distensões, que fossem além de uma certa “erosão”. O trabalho concluiu que

provavelmente a ação conjunta das enzimas (no caso, um extrato comercial contendo xilanases e celulasas) removeu camadas subsequentes da superfície das fibras resultando num “polimento”. Em geral, os estudos de caracterização de polpas em processos de branqueamento com enzimas por MEV ou MET visam fornecer informações complementares aos trabalhos centrados no modo de ação das enzimas.

IV. 1.2 Microscopia de força atômica.

Nos últimos anos uma outra técnica de microscopia desenvolvida em 1986 tem sido aplicada na caracterização de madeiras e polpas, a Microscopia de Força Atômica - MFA (Hanley e col., 1992; Hanley e Gray, 1994; Pereira e Claudio-da-Silva Jr., 1993; Pereira e Claudio-da-Silva Jr., 1995). O método foi inicialmente desenvolvido como alternativa para estudos que queiram examinar a topografia ou superfície de materiais e ainda está em fase de adaptação para análise de materiais lignocelulósicos. A técnica tem sido muito empregada na caracterização da superfície de semicondutores, polímeros e na resolução de problemas da física do estado sólido e engenharias.

Um dos primeiros trabalhos a relatar a caracterização de microfibrilas de celulose de algas através de MFA e compará-la com MET foi realizado em 1992 (Hanley e col., 1992). Desde então vem acontecendo uma grande evolução no método, permitindo uma nova visão da morfologia da superfície dos constituintes da madeira. Em trabalho de Furuta e Gray (1998) a microscopia de força atômica foi utilizada na determinação de curvas de força-distância de polpas sulfito suspensas em água, por aproximação da sonda à superfície das fibras, e os resultados foram interpretados em termos de fibrilação da superfície. Shevchenko e col. (1998) analisaram a morfologia da superfície de complexos lignina-carbohidratos de madeiras duras e moles, bem como ácidos húmicos e fúlvicos através de MFA. A organização estrutural das superfícies analisadas nem sempre coincidiu com os dados anteriormente reportados por MEV, sugerindo que a preparação da amostra desempenha um papel significativo na formação dos agregados. Outra constatação do trabalho foi que as morfologias dos complexos lignina-carbohidratos e os ácidos húmicos e fúlvicos seguiram padrões semelhantes, sugerindo similaridades químicas em suas estruturas.

Em um trabalho muito recente a MFA foi usada para estudar processos de deslignificação, com particular atenção à lignina residual de polpas de *Eucalyptus grandis* (Lorenzoni, 1998). Através de uma técnica distinta de operação e aquisição dos dados (chamada Tapping modeTM with phase) foram analisadas diferentes estruturas de ligninas e amostras de polpas submetidas a branqueamentos ECF e TCF, elucidando peculiaridades das amostras e realizando um estudo comparativo entre os métodos de análises químicas e o método de caracterização por MFA, até então um fato inédito. A MFA permitiu a identificação de características da lignina residual de polpas provenientes de estágios distintos do branqueamento, apresentado resultados coerentes.

O princípio de funcionamento da técnica de MFA é o de um rastreamento puramente mecânico, conduzido por uma sonda muito aguda (“tip”) distante poucos microns (muitas vezes com menos de 100 Å de diâmetro) da superfície a ser estudada. A ponta ou “tip” fica localizada na extremidade livre de uma viga ou “cantilever” e forças que surgem entre o “tip” e a superfície da amostra causam deformações/flexões neste “cantilever”. Um detector óptico mede continuamente as oscilações do “cantilever”, através da incidência de um feixe de laser sobre este último, permitindo que um computador gere um mapa da topografia da superfície. Um esquema geral do microscópio de força atômica e seu funcionamento pode ser visto na figura 28 (Hanley e Gray, 1994; Lorenzoni, 1998).

Os modos de operação do equipamento mais usados são os de força de contato ou de não contato. No primeiro caso, a distância entre “tip” e amostra é de poucos angstroms e são medidas vibrações estáticas do “cantilever”, proporcionais à força entre o “tip” e amostra. No segundo caso, a separação é de cerca de 100 angstroms e o “tip” é montado sobre um “cantilever” suspenso em molas que é oscilado perto de sua frequência de ressonância (cerca de 300 kHz). Muitas forças podem contribuir para as oscilações do “cantilever”: para distâncias maiores que 10 Å, a força normalmente associada é a força interatômica de van der Waals, que será dependente e proporcional à distância entre “tip” e amostra; para distâncias maiores ou iguais a 10 Å devem ser levadas em consideração forças ligadas à mecânica quântica ou forças de caráter químico entre amostra e “tip”(Lorenzoni, 1998).

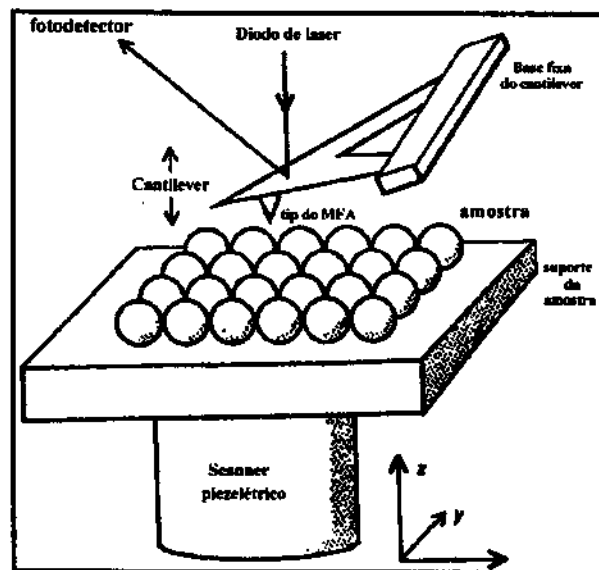


Figura 28. Esquema representativo de um microscópio de força atômica (Hanley e Gray, 1994).

Funcionamento de um MFA: seu elemento chave é o sensor de força microscópica, ou “cantilever”, que é formado normalmente por um ou mais feixes de silício ou nitreto de silício, variando de 100 a 500 μm de comprimento e cerca de 0,5 a 5 μm de espessura. Cristais piezelétricos contribuem para a manutenção da distância entre a sonda e a amostra e para a manutenção das oscilações das deformações sofridas pelo “cantilever” na direção Z (perpendicular ao plano da varredura), graças um sistema de regulação da força aplicada por “feedback”. Através da reflexão do feixe de laser incidente é possível determinar-se os desvios sofridos pelo “cantilever” quando a sonda rastrea a superfície.

IV.1.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse na aplicação de técnicas espectroscópicas e espectrométricas como ferramentas para a caracterização de polpas. Embora estas técnicas sejam usadas já há um longo tempo, o aumento de recursos computacionais e o próprio desenvolvimento de equipamentos cada vez mais sensíveis têm ajudado na elaboração de estudos bastante complexos de caracterização de celulose e lignina, principalmente.

Junto à espectroscopia no infravermelho, amplamente utilizada e padronizada, a espectrometria por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN - ^1H e ^{13}C) sempre foi utilizada para a caracterização de material lignocelulósico, contando atualmente com resultados bastante significativos (Belgagem e col.,1995). A utilização de espectroscopia de RMN em estudos estruturais de fibras de celulose e polpas vem sendo bastante aprimorado, com resultados que permitem a diferenciação das fibras após

submissão destas a diversos tipos de degradação e determinação do grau de cristalinidade da celulose (Newman, 1992.; Newman e col., 1993.).

A literatura apresenta também muitos trabalhos sobre a caracterização de madeiras e polpas de celulose por espectrometria de ressonância magnética nuclear em estado sólido. Vários estudos têm sido publicados com utilização de RMN ^{13}C em estado sólido com polarização cruzada e giro de ângulo mágico (“CP/MAS” – cross polarization and magic angle spinning), focalizando majoritariamente a caracterização de celuloses.

Os trabalhos envolvendo polpação kraft apresentam estudos envolvendo caracterização de uma variedade de grupos funcionais da lignina extraída da polpação, além de análises quantitativas de carboidratos e ligninas por RMN (Himmelsbach e col.,1983; Haw e col.,1984; Hatfield e col.,1987;Newman e col.,1993; Lennholm e col.,1995). Análises de RMN ^{13}C -“CP/MAS” também foram amplamente utilizadas em estudos na área de biodegradação (Hemmingson e Wong, 1989; Hemmingson e Morgan, 1990; Kimura e col.,1992; Gilardi e col.,1994) e recentemente foi utilizada em um estudo quantitativo de biodegradação de madeira por fungos de podridão branca e marrom através da integração dos espectros (Gilardi e col., 1995; Kim e Newman, 1995).

Lennholm e Iversen (1995a,b), em estudos recentes com utilização do método estatístico de análise de componentes principais sobre espectros de RMN ^{13}C , obtiveram resultados promissores para classificar e estimar conteúdo dos diferentes tipos de celulose em fibras obtidas de diversas espécies de madeiras e processos.

Os trabalhos mais recentes sobre aplicação da ressonância magnética nuclear continuam centrados na caracterização de componentes lignocelulósicos isolados de polpas e madeiras, principalmente ligninas. Os estudos têm conseguido distinguir alterações na estrutura da lignina durante os diferentes estágios da polpação, como por exemplo conteúdo de grupos hidroxilas alifáticas e fenólicas, ligações aril-éter e conteúdo de grupos carboxílicos ácidos entre outros (Froass e col., 1998 a,b; Ruggiero e col., 1998). Senior e col. (1998) analisam a lignina residual extraída de polpas durante sequência de branqueamento ECF e concluem que a ordem dos estágios aplicados influencia na característica da lignina residual ao longo do processo. Outro enfoque na caracterização de polpas continua sendo o estudo morfológico da celulose (formas cristalinas e amorfas), visando melhorar sua

solubilidade em álcali e posterior manufatura dentro da indústria de polpa e papel (Rahkamo e col., 1998).

IV.1.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios -X.

Dentre as novas técnicas de caracterização de superfícies de polpas de celulose destaca-se a espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X, mais conhecida como XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) e, em alguns casos como ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis). Nos últimos anos, a utilização deste método tem contribuído muito em estudos que envolvem branqueamento de polpas, principalmente na análise da distribuição da lignina residual presente na superfície. A espectroscopia de fotoelétrons de raios-X fornece informações detalhadas da composição química da superfície de um material qualquer. Ela pode determinar quantitativamente a composição elementar e de grupos funcionais numa espessura de até 10 Å.

O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na interação dos fótons de raios-X com os orbitais atômicos e moleculares da amostra. A energia do fóton de raio-X é usada para ionizar a amostra liberando elétrons que, após passarem por um monocromador de energia, chegam ao detector. Se a energia dos fótons é maior que aquela requerida para remover os elétrons da amostra, o excesso de energia é passado ao elétron como energia cinética de acordo com a equação:

$$E_k = h\nu - E_b + \phi$$

onde E_k é a energia cinética, $h\nu$ é a energia do fóton de raio-X, E_b é a energia de ligação e ϕ é a função de trabalho do espectrômetro. A energia do fóton é transmitida ao elétron, que é ejetado, deixando a amostra num estado excitado. A volta ao estado fundamental pode ocorrer de várias maneiras, sendo as principais a fluorescência de raio-X e a emissão de elétrons auger. Estes últimos também podem ser analisados por XPS (de Castro, S.G.C., 1996). Um esquema ilustrativo do princípio da técnica pode ser observado na figura 29.

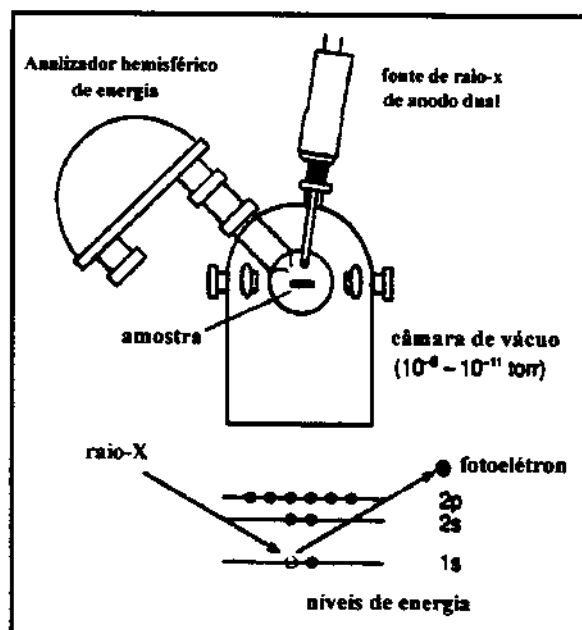


Figura 29. Esquema de um equipamento de XPS e princípio de emissão de fotoelétrons de raio-X (Perry e Somorjal, 1994).

Toda a informação obtida é processada por um computador, de modo a produzir um espectro de intensidades de fotoelétrons em função das energias de ligação. A posição dos picos de energia de ligação permite que seja feita a identificação do elemento e do ambiente químico da ligação, já que para cada elemento em uma dada ligação química corresponde uma energia específica. A quantidade ou concentração do elemento é obtida através da determinação da área do pico, com aplicação de fatores de correção e sensibilidade apropriados (Kazayawoko e col., 1998).

Os trabalhos envolvendo XPS e materiais lignocelulósicos, em geral preocupam-se em estudar as modificações sofridas pela lignina, seja durante processos de polpação e branqueamento como em casos específicos de alteração da estrutura do composto visando outras aplicações (Kazayawoko e col., 1998). A técnica também tem se mostrado muito útil para a correlação de propriedades físicas com modificações na distribuição de carga ou na composição da superfície, tornando-se de muita utilidade em estudos envolvendo modo de ação de enzimas em processos de branqueamento.

A superfície de polpas kraft não branqueadas e branqueadas em sequências utilizando ozônio, oxigênio, peróxido e dióxido de cloro foram estudadas através XPS e titulações

potenciométricas e de polieletrólitos. Os resultados foram comparados com o teor de lignina e com propriedades físicas e químicas da polpa e do papel resultante. Através das determinações realizadas por XPS foi possível calcular o percentual de superfície recoberto por lignina e por extrativos. As análises mostraram que é possível correlacionar alterações na superfície da polpa, como diminuição da quantidade de carga com a extração da lignina e com alterações nas propriedades físicas da polpa (Laine e col., 1994; Stenius e Laine, 1994; Laine e col., 1996a,b). Apesar de seu crescente uso na caracterização de superfícies de polpas de celulose, poucos trabalhos de XPS apresentam resultados referentes à caracterização de polpas de madeira dura tratadas com xilanase (Buchert e col., 1996).

Resultados semelhantes aos acima foram encontrados em estudos realizados com polpas kraft de eucalipto obtidas de sequências de branqueamento convencionais e em polpas kraft branqueadas através de sequência totalmente livre de cloro. Em relação ao branqueamento TCF, a variação da carga superficial mostrou-se correlacionada com o tipo de extração a que foi submetida a lignina residual, dissolução (ozônio, oxigênio e extração alcalina) ou oxidação (peróxido), diminuindo e aumentando respectivamente (Kuys e col.,1995).

A atuação de xilanases e mananases no branqueamento de polpas kraft de madeira mole foi investigada utilizando XPS. Numa polpa de “pinus” convencional, xilanase apresentou remoção da xilana e da lignina mais exposta da superfície das fibras. Também foi mostrado que em polpas convencionais, ambas enzimas atuam com relativa maior eficiência na superfície externa. No entanto, a maioria do ataque promovido por elas dá-se diretamente na hemicelulose de toda a polpa (Viikari e col.,1995).

Os trabalhos mais recentes sobre utilização de XPS na caracterização de polpas de celulose demonstraram grande interesse na investigação do papel dos extrativos e da lignina nas características da superfície das polpas. Shen e col. (1998a) realizaram um estudo centrado na composição química, energia da superfície e nas características ácido-base de Lewis da lignina, celulose e de polpas kraft de eucalipto. Foram também estudados os efeitos das alterações da composição da superfície nos parâmetros dispersivos da energia e nas características ácido-base das polpas.

Em trabalho paralelo, polpas branqueadas de eucalipto foram analisadas por XPS e cromatografia gasosa inversa. Foi estudado, entre outros fatores, o efeito da extração, tamanho e reciclagem das fibras em características ligadas a energia da superfície. A extração das fibras, com remoção basicamente de lignina e extrativos que reprecipitam na superfície durante a lavagem, teve como consequência o aumento da energia e polaridade da superfície. A superfície das fibras recicladas mostrou-se mais hidrofóbica, provavelmente devido à redeposição de componentes das tintas ou dos reagentes químicos do destintamento (Shen e col., 1998b).

IV.1.5 Espectroscopia no infravermelho e infravermelho próximo.

Com o maior desenvolvimento dos “hardwares” computacionais e sofisticação dos métodos de interfaciamento, no início dos anos 90 surgiram inúmeros trabalhos centralizados na utilização das técnicas espectroscópicas na classificação de diferentes espécies de madeiras e tipos de polpas ou na quantificação de seus constituintes. Para tanto, têm sido utilizados os resultados de análises químicas e espectroscópicas, que são analisados segundo métodos estatísticos de análise ou análise multivariada. Graças à maior disponibilidade e popularidade destes métodos as espectroscopias no infravermelho e infravermelho próximo, cuja metodologia aplicada a estudos de materiais lignocelulósicos é bastante antiga, estão sendo novamente muito exploradas.

Como grande parte dos trabalhos atuais vêm recorrendo ao auxílio da análise multivariada, um breve resumo introdutório do assunto será apresentado a seguir.

Análise multivariada

A análise multivariada compreende uma gama de métodos estatísticos acionados para ajudar na análise dos dados de um sistema qualquer quando mais de uma variável é medida sistematicamente. Nas últimas décadas ela passou a ser muito requisitada para o tratamento de dados químicos, crescendo em popularidade e dando origem a uma nova disciplina chamada quimiometria.

A quimiometria tem sido utilizada para definir ou selecionar condições ótimas de medição e experiência, e extrair de dados químicos o máximo de informações. Um dos seus objetivos é a conversão de dados em informação e finalmente em conhecimento que possa ser utilizado na redução de problemas. Para isso são utilizados métodos exploratórios e de reconhecimento de padrões, métodos de calibração e previsão e, mais recentemente, métodos de inteligência artificial. As técnicas de análise multivariada tratam todas as variáveis simultaneamente, podendo rapidamente extrair as mais importantes, e permitindo identificação rápida e eficiente de relações básicas porventura existentes em uma grande massa de dados (Scarminio, 1989).

Neste trabalho um maior enfoque será dado à Análise de Componentes Principais – PCA (Principal Component Analysis) dentro da área de análises multivariadas. Essa técnica é muito utilizada tanto em métodos de calibração multivariada como em métodos de reconhecimento de padrões e de classificação.

A PCA também é denominada por alguns autores de análise fatorial, projeção de autovetores ou decomposição em valores singulares. É uma técnica estatística bastante conhecida para análise de grandes conjuntos de dados, que extrai o caráter básico (padrões ou fatores) dos resultados. Esses fatores são chamados Componentes Principais ou CPs, e são combinações lineares das variáveis originais.

A PCA decompõe uma matriz de dados qualquer X , composta por “ n ” linhas referentes às amostras e “ p ” colunas referentes às variáveis, em novas matrizes que são produtos de vetores chamados de “scores” e “loadings”.

$$X = 1 \cdot \bar{x} + TP' + E \quad \text{onde,}$$

$\bar{x}$ é o vetor linha com média dos valores de todos os descritores do sistema.

T e P = matriz dos “scores” e “loadings”, respectivamente.

E = matriz dos resíduos contendo os desvios da média.

A redução da matriz de dados e a eliminação da informação redundante se dá através da construção de um sistema de eixos não correlacionados, onde as novas variáveis resultantes devem ser ortogonais entre si. Imaginando um sistema bidimensional (n amostras e 2 variáveis), a primeira componente principal seria portanto, uma reta projetada ao longo

de X na direção de maior variância dos dados. Os “scores” desta CP são as projeções das amostras na direção da CP enquanto que os “loadings” são os cossenos dos ângulos formados entre a CP e cada variável. De uma maneira mais genérica pode-se dizer que os “scores” fornecem a composição das CPs em relação às amostras, enquanto os “loadings” fornecem o mesmo tipo de informação em relação às variáveis. Para obtenção das demais componentes principais, traça-se uma outra reta, perpendicular à primeira, de modo que os novos resíduos sejam os menores possíveis. A reta da Segunda CP estará então na direção da maior variância restante depois de extraída a reta da primeira componente (Scarminio, 1989 ; Stoyanova e col., 1995; Cadet e col., 1995).

Aplicação de PCA na caracterização de polpas de celulose por FTIR e NIR.

Junto à espectroscopia no infravermelho (usualmente FTIR – fourier transformed infrared), intensamente utilizada na caracterização de lignina, vêm ganhando um destaque significativo os resultados adquiridos através de análises por espectroscopia no infravermelho próximo (usualmente NIR – near infrared). As duas técnicas, aliadas à aplicação de métodos de análise multivariada, abriram um novo caminho no estudo de polpas e madeiras, cujo principal objetivo consiste em encontrar meios mais simples e rápidos para monitorar os processos de polpação e branqueamento.

Tendo como base as propriedades físico-químicas e espectros de FTIR, NIR, RMN ^1H e RMN ^{13}C do material a ser estudado, Wallbacks e col. (Wallbacks e col., 1991 a,b; Wallbacks e col., 1995) mostraram, em uma série de trabalhos, que polpas de celulose obtidas de diferentes processos poderiam ser diferenciadas pelos seus espectros e que propriedades físicas e teores de alguns dos constituintes tinham boa correlação com os espectros, podendo ser previstos apenas pelos dados espectroscópicos. Nestes trabalhos foram utilizados métodos estatísticos de reconhecimento de padrões (Análise de Componentes Principais - PCA), de calibração (Regressão por Mínimos Quadrados - PLS) e de classificação (Modelos independentes de Similaridade Utilizando Componentes Principais - SIMCA). A conclusão destes e de outros trabalhos similares indicou ser possível extrair informações mais úteis de análises espectrométricas e espectroscópicas de modo a

permitir a caracterização, classificação e quantificação e de espécies químicas de polpas e madeiras.

A determinação quantitativa de grupos acetila, conteúdo de hidroxilas fenólicas e lignina total ou outras características de materiais lignocelulósicos baseando-se em dados espectroscópicos de FTIR ganhou grande impulso a partir de 1990 (Faix e col., 1992; Faix e col., 1993), e ainda é um ramo em desenvolvimento na área de caracterização de polpas e madeiras. Zanuttini e col. (1998) por exemplo, num método para determinação de grupos acetila em madeira de algodão, obtiveram resultados com boa correlação com valores obtidos por cromatografia gasosa.

Os estudos envolvendo a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo eram bastante raros no início (Wright e col., 1990), mas têm ganho muita importância desde então. Os trabalhos têm centralizado sua atenção na caracterização de polpas, através da correlação dos espectros obtidos com as propriedades de maior interesse, como por exemplo: número kappa, viscosidade, alvura, rendimento de cozimento, teor de açúcares, conteúdo de lignina, índices de rasgo e estouro entre outros. O interesse na técnica vem aumentando graças aos resultados muito promissores obtidos, com coeficientes de correlação acima de 0,9. Isto possibilitaria a previsão das características de uma dada polpa ou madeira somente com os resultados obtidos por NIR (Michell, 1995; Schimleck e col., 1996; Antti e col., 1996). Lindgren e Edlund (1998), em estudo conduzido durante cozimento kraft de madeira mole, utilizaram dados de espectroscopia no infravermelho próximo e PLS para prever os índices de número kappa e lignina klason, com resultados promissores. Em outro estudo, polpas kraft de “pinus” e bétula, submetidas a branqueamentos TCF e ECF, tiveram suas propriedades químicas e físicas correlacionadas através da utilização de análise de componentes principais (Seisto e col., 1998).

Os outros estudos envolvendo NIR de madeiras têm se voltado para a classificação de diferentes espécies de madeiras, através da criação de modelos de classificação baseados na Análise de Componentes Principais dos espectros obtidos. O método tem se mostrado eficiente para diferenciar as espécies de madeiras duras das madeiras moles, diferenciar espécies de madeiras duras e moles entre si e até mesmo diferenciar madeiras da mesma espécie provenientes de sítios distintos (Brunner e col., 1996; Michell e Schimleck, 1998).

Os espectros de NIR observam basicamente os grupos -OH, C-OH, C=O e C-H de compostos lignocelulósicos, que aparecem como um espectro de bandas largas. Esta suposta limitação é sanada com a utilização de artifícios matemáticos, como a segunda derivada do espectro por exemplo, que podem melhorar os resultados da aplicação subsequente dos métodos estatísticos de análise. Em uma breve revisão da literatura sobre a aplicação de NIR no estudo da madeira e seus derivados Pope (Pope, 1995) apresenta alguns casos onde a segunda derivada do espectro pôde ser utilizada para correlacionar o conteúdo de lignina com as bandas nas regiões de 1680nm e 2100-2200 nm.

O objetivo central desta parte do trabalho de tese consiste numa busca de métodos auxiliares de caracterização das polpas, com a finalidade de contribuir com mais dados que possam ajudar a esclarecer melhor o papel desempenhado pelas xilanases dentro do branqueamento.

IV.2 Material e Métodos

IV.2.1 Material

IV.2.1.1 Polpas: As polpas utilizadas nos experimentos descritos a seguir correspondem às amostras das polpas kraft de eucalipto submetidas aos processos de branqueamento XOP/(O)XOP e XZP/(O)XZP e apresentadas no capítulo anterior. Com exceção dos casos especificados, as polpas foram transformadas em folhas através de suspensão em água destilada seguida de filtração à vácuo em funil de buchner.

IV.2.2 Métodos

IV.2.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão: As fibras da polpa foram pré tingidas em solução aquosa 0,5% de acetato de uranila durante 12 horas. Após desidratação usando uma série de soluções etanólicas (sequencialmente 30, 60, 90, 100 e 100%) as amostras foram embebidas com uma resina epóxida segundo Spurr (1969). Secções ultrafinas de cerca de 50 nm de espessura foram preparadas utilizando Ultramicrotomo LKB - Nova. Antes da análise, as amostras foram tingidas durante 1 hora com solução 1% de permanganato de potássio. As observações e fotografias foram realizadas com o microscópio Zeiss EM 10C, a 80 KV.

IV.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura: Amostras das polpas secas foram coladas em um suporte de alumínio e cobertas com filme de carbono condutor, e em seguida recobertas com filme de ouro utilizando o metalizador Baltec modelo Med 020. As observações e fotografias foram obtidas através do microscópio eletrônico Jeol JSM – T300 a 15 e 20 KV.

IV.2.2.3 Microscopia de força atômica: Foram realizadas suspensões, numa faixa de 1% a 0,1%, das polpas em água deionizada utilizando o aparelho de ultrasom Coli Parmer-X

durante pulso contínuo de 1 minuto. Uma gota de cada suspensão foi depositada sobre uma lamínula de vidro e seca a 70°C por um período superior a 4 horas.

As imagens da superfície foram geradas utilizando microscópio Topometrix TMX 200, com tip padrão Topometrix de silício e constante de força sobre o cantilever de 0,045 N/m.

IV.2.2.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear: As amostras de polpa obtidas no branqueamento foram desfiadas manualmente e empacotadas em um rotor cilíndrico de óxido de zircônio com diâmetro de 7. Os espectros de RMN ^{13}C em estado sólido foram realizados em um espectrômetro Bruker AC 300/P, operando a uma frequência de 75,5 MHz. O rotor girou a 4KHz em uma sonda científica de giro de ângulo mágico, e o tempo de contato com a polarização cruzada para cada amostra foi de 1 ms, com 360 ms de tempo de aquisição e 3s de parada para ajuste da magnetização do próton. A largura espectral situou-se a 22,7 KHz, com número de aquisição de pontos de 16 K e 384 espectros acumulados.

IV.2.2.5 Espectroscopia no infravermelho: as folhas de polpa obtidas em cada estágio de branqueamento foram secas e submetidas à análise por espectroscopia no infravermelho através de reflectância difusa, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 256 varreduras. Para isso foi utilizado espectrofotômetro Nicolet-520, equipado com acessório para determinações através de medidas de reflectância difusa. KBr foi utilizado como referência para a linha base.

IV.2.2.6 Espectroscopia no infravermelho próximo: as mesmas amostras submetidas à análise por espectroscopia no infravermelho foram analisadas utilizando espectrofotômetro UV-VIS-NIR CARY - 5G, em modo de reflectância difusa, no intervalo espectral de 1100 a 2500 nm. Para calibração do equipamento foi utilizado seu próprio padrão.

IV.2.2.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X: Algumas das amostras de polpa e uma amostra de lignina de moinho de bola (MWL) foram submetidas à análise por XPS em ambiente de ultra-alto vácuo (pressão na faixa de 10^{-9} Torr). As

amostras foram analisadas por XPS antes e depois de uma extração com diclorometano. Foi empregada como fonte excitadora a radiação $K\alpha$ do magnésio, com energia de 1253,6 eV e potência de 225W, dada pela voltagem de 15KV e emissão de 15mA. Para evitar o carregamento das amostras foi usado um canhão de elétrons. Foram obtidos os espectros exploratórios (faixa de energia de ligação de 0 a 1200eV) e os espectros de alta resolução de C 1s e O 1s. Como referência de energia de ligação foi usado o valor de 284,8 eV para contribuição à linha fotoelétrica C 1s de carbono associada a C-C. O ajuste dos picos foi realizado utilizando-se programa fornecido pelo fabricante do equipamento, com curvas gaussianas, subtração de background pelo método de Shirley e a rotina de mínimos quadrados. O equipamento utilizado foi o espectromicroscópio de superfícies Kratos Analytical XSAM-HS.

IV.2.2.8 Análise de componentes principais: os espectros resultantes das análises no infravermelho e infravermelho próximo (FTIR e NIR respectivamente) foram submetidos à análise de componentes principais - PCA utilizando o software comercial MatLab (PLS Toolbox). Os espectros de FTIR foram agrupados em matrizes, normalizados e as matrizes correspondentes centralizadas na média antes da análise. Os espectros de NIR, também organizados em matrizes, foram transformados à 1ª derivada antes de serem submetidos à análise por PCA.

IV.3 Resultados e discussão

No capítulo anterior pôde-se observar algumas das características de polpas kraft de eucalipto no decorrer de processos de branqueamento totalmente livres de cloro e com estágio enzimático. É interessante notar, como em outros trabalhos da literatura, que o efeito positivo da adição de xilanases (chamado de “bleaching boosting effect”) é mais facilmente detectado do que o modo pelo qual estas enzimas atuam no processo, ou seja, os métodos utilizados são mais sensíveis aos efeitos do que às suas causas. Isto porque, a lignina residual que deve ser removida está presente em quantidades muito inferiores à celulose, tornando-se portanto, bastante inacessível tanto para análises *in situ* como para o seu isolamento.

Este capítulo vem apresentar um estudo complementar ao anterior, na tentativa de encontrar novos meios de caracterização de polpas que possam ajudar no esclarecimento do modo de ação das xilanases dentro do processo de branqueamento. Sabendo que a xilana é o carboidrato mais associado à lignina e com conhecimento dos benefícios da aplicação de xilanase, espera-se que uma caracterização mais completa das polpas, mesmo com maior evidência da celulose e hemicelulose, possa trazer mais luzes à questão.

Dentro deste contexto, uma série de técnicas de análise química de superfícies (mencionadas no item IV.2.2) foi inicialmente selecionada para caracterizar amostras de polpas provenientes de um branqueamento TCF/XOP. Nesta fase foram avaliadas o nível de informação proporcionado pelo método, bem como sua viabilidade experimental. Aqueles métodos considerados de baixa contribuição foram descartados e os estudos sequenciais centralizaram-se nas técnicas com resultados mais significantes, sendo aplicados no estudo das polpas provenientes do branqueamento XOP e XZP (vide item III.2.2).

IV.3.1 Seleção das técnicas de análise de superfície.

Dentre todas as técnicas avaliadas (MET, MEV, MFA, XPS, RMN ^{13}C , FTIR, NIR) observou-se que XPS, FTIR e NIR poderiam, em tempo compatível com o desenvolvimento do trabalho de tese, contribuir de maneira mais efetiva para estudo de polpas de celulose. Isto não implicou necessariamente num abandono total das demais técnicas. A microscopia eletrônica de varredura por exemplo, apresentou, ainda na fase de seleção, resultados que

puderam ser aproveitados para o desenvolvimento do trabalho. Os principais resultados e conclusões sobre a avaliação das técnicas estudadas estão resumidos a seguir.

Avaliando os métodos de microscopia (microscopia eletrônica de transmissão - MET, varredura - MEV e microscopia de força atômica - MFA) verificou-se que:

a) MET: Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão não apresentaram resultados satisfatórios, com pouca ou nenhuma evidência do efeito enzimático sobre as polpas. Devido à disponibilidade do equipamento e também à preparação da amostra, esta técnica foi abandonada. Algumas imagens de MET das polpas podem ser vistas no apêndice 3.

b) MEV: De um modo geral, todas as imagens das polpas estudadas, durante branqueamento XOP e XZP, permitiram a observação de características morfológicas da superfície das polpas. Entretanto, foi observado que alterações significativas entre as polpas controle e as enzimaticamente tratadas só ocorreram no estágio do tratamento enzimático propriamente dito (estágio X). Outro ponto interessante foi que, independente do tipo de sequência de branqueamento, as diferenças morfológicas das superfícies mencionadas seguiram o mesmo padrão: as polpas controle (sem exposição às xilanases) apresentaram fibras mais rugosas e com alto conteúdo de fibrilas enquanto as polpas tratadas com xilanases apresentaram fibras mais aplainadas e “limpas” de fibrilas. Nenhum sinal de quebra ou rompimento das fibras foi detectado após a utilização de xilanases. Este padrão de ação da enzima pode ser relacionado à degradação da xilana superficial, apresentando-se como mais um dado ilustrativo dentro do estudo do modo de ação da enzima. O apêndice 4 apresenta algumas imagens representativas do processo acima descrito.

c) MFA: A grande dificuldade em estudar-se polpas de celulose por este método está relacionada principalmente à sua recente história na caracterização de materiais lignocelulósicos. A preparação da amostra, por exemplo, é um dos aspectos importantes para o sucesso da análise. Seguindo sugestões da literatura até então disponível (Hanley e col., 1992; Hanley e Gray, 1994; Pereira e Claudio-da-Silva Jr., 1995) optou-se pela tentativa de análise de filmes de polpa, com a finalidade de permitir um contato bastante estreito entre a ponta da sonda e a amostra. Após realização de um estudo de MFA de polpas submetidas a

uma das sequências de branqueamento XOP nenhuma diferença entre as polpas controle e as enzimaticamente tratadas foi encontrada. Observou-se inclusive uma certa dificuldade de rastreamento da superfície das amostras durante a análise.

Na busca de soluções para melhorar a sensibilidade do método verificou-se que para uma investigação de superfícies de polpas com possível visualização da lignina residual seria necessário toda uma adaptação do “tip” e do “cantilever”. Foi notado em nosso trabalho uma falta de aderência do “tip” em muitas regiões da fibras, tornando a imagem da superfície “desfigurada”. Como o “tip” padrão é composto de silício, conclui-se que este demonstre mais afinidade para grupos do tipo -OH e que a falta de aderência tenha se dado justamente em regiões menos polares da fibra. O perfil das imagens obtidas através de MFA pode ser visto no apêndice 5.

Em um trabalho bastante recente (Lorenzoni, 1998) foi mostrado que a técnica de MFA pode ser muito útil na caracterização de material lignocelulósico, mas que todo o processo ainda está em fase de desenvolvimento. No trabalho, foi realizada uma investigação bastante minuciosa de uma série de polpas e de ligninas extraídas de *Eucalyptus grandis* através de MFA. O trabalho mostrou não só modificação química do “tip” (nitrito de silício) e do “cantilever”, como também apresentou um distinto modo de operação do equipamento chamado “Tapping mode with phase”. Por este método o “tip” fica constantemente batendo na amostra (é um meio híbrido entre as técnicas de contato e não contato normalmente utilizadas), criando outras possibilidades de análise como por exemplo o mapeamento da fase do sinal de oscilação do “cantilever”. Através deste artifício a imagem formada pode ir além do mapeamento topográfico e detectar variações na composição, adesão, fricção e viscoelasticidade da amostra.

Em decorrência de todas estas particularidades os estudos com MFA não foram retomados durante o trabalho de tese que se seguiu. Nada impede porém, que esta técnica venha a ter um grande papel a desempenhar no desenvolvimento futuro de novos métodos de caracterização de polpas durante os processos de branqueamento.

A avaliação das técnicas espectrometria de ressonância magnética nuclear em estado sólido e espectroscopia (de fotoelétrons de raio-X, infravermelho e infravermelho próximo) apresentou os seguintes resultados:

d) RMN (^{13}C -CP/MAS): Os espectros de RMN em estado sólido obtidos apresentaram bandas largas que, com auxílio da literatura (Gilardi e col., 1995), puderam ser relacionadas a uma mistura do espectro da celulose e da xilana, com maior ênfase para o componente celulósico. O método não se mostrou sensível para detectar sinais provenientes da lignina residual, mesmo nas polpas kraft não branqueadas. Após o tratamento com xilanases nenhuma alteração no perfil dos espectros foi observada.

O grande obstáculo apresentado pela técnica foi mesmo o da sensibilidade para detectar alterações produzidas pelo tratamento enzimático, seja a nível da lignina residual quanto a nível de degradação ou alteração estrutural dos carboidratos. Infelizmente, a maior parte da literatura trabalha com caracterização da madeira *in situ*, ou então dos seus componentes em separado. No caso dos estudos de polpas de celulose durante branqueamento, a baixa concentração de lignina e xilana em relação à celulose faz com que o sinal desta última domine todo o espectro (ver apêndice 6).

Em continuação ao nosso trabalho, Alderete e col. (1998) realizaram estudo minucioso da técnica, na tentativa de viabilizar uma caracterização pormenorizada das polpas. No trabalho, utilizaram a espectrometria de RMN de carbono 13 em estado sólido através de CP/MAS e CP/MAS-DP (polarização cruzada e giro de ângulo mágico com desfase dipolar) a fim de aumentar a sensibilidade do método. Os resultados demonstraram que mesmo após hidrólise enzimática com celulase (e desse modo isolar não quimicamente a lignina residual e xilana) os espectros continuavam dominados pelos sinais da celulose. Assim, concluiu-se que esta técnica se mostra atualmente inviável para o estudo de polpas submetidas a um tratamento com xilanases.

e) XPS, FTIR e NIR: Os resultados preliminares da análise de polpas por XPS, apesar de realizados sem o equipamento mais adequado, mostraram que a técnica poderia ser sensível para detecção de alterações nos grupos funcionais das amostras de polpa durante o branqueamento. Desse modo, buscou-se um equipamento mais adaptado a este tipo de amostra para dar prosseguimento ao trabalho. Logo a seguir, os resultados definitivos serão apresentados e discutidos em detalhe.

As primeiras investigações de caracterização das polpas por FTIR e NIR apresentaram espectros muito similares, de difícil interpretação visual. Procurando caminhos alternativos que pudessem ajudar na comparação e interpretação dos espectros observou-se que a aplicação da análise de componentes principais – PCA poderia ser um método exploratório destes dados. Os resultados deste trabalho de comparação dos espectros através de PCA também serão discutidos em detalhes nos próximos itens.

IV.3.2 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X

As Tabelas 10 e 11 apresentam os resultados referentes à análise das polpas submetidas à sequência de branqueamento com ozônio – (O)XZP (tabelas 8 e 9 do capítulo III) através de Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS). Foram escolhidas para o estudo 2 amostras (polpa controle e tratada com 10U/g de xilanase) do estágio X (início do branqueamento) e 2 amostras do estágio P (final do branqueamento), além de uma amostra de lignina de *Eucalyptus grandis*. Os elementos analisados foram carbono (C_{1s}) e oxigênio (O_{1s}) e o perfil dos espectros de XPS da lignina e das amostras de polpas podem ser vistos anexados no apêndice 7.

Tabela 10. Análise de polpas kraft e lignina de eucalipto através de XPS.

Amostra	Posição Elemento / eV				
	C1	C2	C3	C4	O
Lignina	284,8	286,5	288,1	292,1	532,7
Controle X	284,8	286,5	287,8	-	532,9
X ₁₀	284,8	286,5	288,0	-	532,9
Controle P	284,8	286,5	288,0	-	532,7
X ₁₀ ZP	284,8	286,5	288,1	-	532,8

Amostra Controle X = controle estágio X ; X₁₀ = estágio X - tratamento com 10U/g xilanase; Controle ZP = controle estágio P e X₁₀ZP = estágio P - tratamento final (ozônio-peróxido) da polpa X₁₀.

A atribuição das bandas de carbono normalmente encontradas na análise de XPS de polpas é realizada de acordo com o deslocamento sofrido em relação à banda centrada em aproximadamente 284,8 eV (C1), correspondente à ligação química de carbono não oxidado (C-C/C-H). As demais ligações com átomos de oxigênio apresentam deslocamentos específicos assim atribuídos: 1,5 a 1,9 eV para C-O (C2); 2,8 a 3,4 eV para C=O / O-C-O

(C3) e 4,1 a 4,7 eV para O-C=O (C4). Este tipo de atribuição de bandas é padrão para todas as análises de polpas por XPS (Laine e col., 1994; Istone, 1995; Buchert e col., 1996).

Nas análises aqui apresentadas foram encontradas três bandas para o espectro do C_{1s} das polpas de celulose, centradas em aproximadamente: 284,8 eV; 286,5 eV e 288,0 eV, indicando que as ligações predominantes entre carbono e oxigênio são do tipo C-O ou C=O/O-C-O, sendo que as polpas analisadas não apresentaram grupos O-C=O. A lignina por sua vez, apresentou uma banda muito suave em 292,1 eV, indicando uma quantidade muito reduzida destes grupos (vide apêndice). Através de cálculos específicos das áreas das bandas foi possível estimar-se a concentração atômica de cada tipo de carbono (tabela 11).

Tabela 11. Distribuição da concentração atômica de C1s e O1s.

Amostras	Concentração atômica / %				
	C1	C2	C3	C4	O
Lignina	23,26	44,26	3,15	1,28	27,82
Controle X	22,39	31,01	13,82	-	31,62
X ₁₀	20,51	35,19	12,54	-	31,76
Controle P	20,34	36,76	11,63	-	31,27
X ₁₀ ZP	19,74	35,78	10,52	-	33,97

Segundo a literatura, a quantidade de carbono alquil (C-C) nos componentes da polpa de celulose decresce na ordem : extrativos > lignina > carboidratos. Com base neste fato é esperado que a eliminação de lignina da polpa faça a razão O/C aumentar, sendo este um dos parâmetros para estudar a deslignificação. Laine e col. (Laine e col., 1994) sugerem que os grupos carboxílicos poderiam indicar a presença de grupos ácidos ligados à lignina, formados provavelmente durante a polpação alcalina e também mostraram forte relação entre diminuição do número kappa e redução de C1. Torr e col. (Torr e col., 1996) observam que C3 estaria relacionado à presença de grupos C=O na celulose, observando que a razão C3/C1 decresce significativamente durante branqueamento de madeiras com H₂O₂, pois este tratamento seria responsável pela transformação de grupos cromóforos (coniferaldeídos e carbonilas).

Buchert e col. (Buchert e col., 1996) observaram que a razão O/C total não era alterada pelo tratamento de polpas de abeto (madeira dura) com xilanase, mesmo com outros

parâmetros indicando hidrólise enzimática e deslignificação, enquanto o mesmo tratamento para polpas de pinus (madeira mole) apresentava redução da razão O/C. Este fato indicou que, no caso da polpa de madeira dura, a lignina deveria estar localizada superficialmente ou juntamente com a xilana reprecipitada, podendo ser eliminada com a xilana durante a hidrólise enzimática. Já, no caso da polpa de madeira mole, a lignina deveria estar localizada preferencialmente sob a xilana reprecipitada, acarretando um aumento na quantidade de lignina (e portanto C1) na superfície após o tratamento com xilanase.

Tabela 12. Razões O/C total e C/C parciais da análise de XPS.

Amostra	O/C	C2/C1	C3/C1
Lignina	0,39	1,90	0,14
Control. X	0,47	1,38	0,62
X₁₀	0,47	1,72	0,61
Control P	0,45	1,81	0,57
X₁₀ZP	0,51	1,81	0,53

As tabelas 11 e 12 mostram um perfil levemente distinto, tanto da polpa quanto da lignina de *Eucalyptus grandis*. Apesar da lignina apresentar um valor de O/C equivalente ao encontrado pela literatura (um valor ao redor de 0,32 para lignina kraft e 0,39 para lignina de pinus de moinho apresentado por Carlsson e col.,1994) observa-se todavia que há uma distribuição inversa entre C1 e C2. Pelos resultados da literatura o valor de C1(cálculo feito em relação ao percentual total de carbono) para a lignina kraft de pinus situa-se perto de 50%, enquanto o valor de C1 da lignina neste caso situou-se em cerca de 32%. Tal fato pode ser um indício de que na lignina de eucalipto o oxigênio deva estar participando quase que totalmente de ligações simples do tipo $R_3C-O-CR_3$.

Ao analisar-se os dados da tabela 12, observou-se um leve aumento da razão O/C do início ao final do branqueamento. Este pequeno aumento, analisado isoladamente, não indicaria uma perda de lignina equivalente à deslignificação observada pelos parâmetros das Tabelas 1 e 2. Entretanto, o efeito do tratamento enzimático na polpa fica bastante evidenciado quando analisa-se as alterações da razão O/C juntamente com as alterações nas razões entre os diversos carbonos encontrados. Observa-se que a razão C2/C1 aumenta consideravelmente (uma alteração de 0,1 unidades já é indicativo de diferença entre

amostras), principalmente após o tratamento enzimático (de 1,38 vai para 1,72). O grande aumento de C2/C1 junto com o leve aumento de O/C indica que pode haver um equilíbrio entre a eliminação de grupos C-C/C-H e C-O. Após o tratamento enzimático observa-se um grande aumento de C2/C1 mas a razão O/C total é mantida. Isto indica que o tratamento enzimático pode tanto estar eliminando lignina, fazendo com que a razão C2/C1 fosse alterada por redução de C1 e que o efeito seja minimizado em O/C por causa da hidrólise da xilana; mas pode também estar apenas evidenciando a degradação da xilana e, neste caso, o aumento da razão C2/C1 dar-se-ia pela maior exposição da lignina na superfície.

Nas etapas subsequentes do branqueamento as alterações foram menores e as razões C2/C1 e O/C foram similares às encontradas para a polpa tratada com enzima. O branqueamento com ozônio e peróxido levou a um maior índice de deslignificação, mas também provocou queda na viscosidade, evidenciando algum tipo de transformação da celulose. Este fato pode estar relacionado à manutenção dos valores observados.

Analisando o comportamento das polpas através da razão C3/C1 observou-se que a mesma manteve-se constante, com leve queda ao final, podendo indicar que o processo de deslignificação com ozônio e peróxido dá-se não somente por eliminação da lignina, mas também por modificação dos grupos cromóforos levando ao aumento de C3 (C=O). O tratamento com ozônio pode levar à formação de grupos carbonila na celulose o que também pôde contribuir ao equilíbrio observado na razão C3/C1 durante o processo.

Uma outra utilidade da técnica de XPS é a possibilidade de estimar-se o percentual de lignina na superfície da polpa analisada. Para que isto seja possível é necessário que as amostras sejam submetidas à eliminação dos extrativos, ou material de peso molecular mais baixo (ácidos graxos, por exemplo), para que a polpa analisada seja considerada composta somente de carboidratos e lignina residual. Os solventes mais utilizados têm sido acetona e diclorometano. Após a extração um novo espectro de XPS é obtido e através da equação abaixo calcula-se o percentual de lignina da superfície(ϕ)(Laine e col., 1996):

$$\text{Eq.1} \quad \phi_{\text{lignina}} = \frac{\text{O/C (polpa após extração)} - \text{O/C (carboidratos)}}{\text{O/C (lignina)} - \text{O/C (carboidratos)}}$$

Usualmente o valor de O/C para os carboidratos é estimado em 0,83, que seria o valor teórico da razão O/C para a celulose. A aproximação pode ser justificada assumindo que valores de O/C para celulose e xilana devam ser muito próximos. Baseando-se neste método as mesmas amostras apresentadas nas tabelas 11 e 12, foram submetidas a uma extração com diclorometano (DCM) com obtenção dos novos espectros de XPS em seguida. Os resultados podem ser vistos na tabela 13.

A primeira diferença visível foi a presença, mesmo em quantidade mínima, de grupos carboxílicos (C4) em todas as amostras, seguido de leve redução em C3 enquanto o percentual de C1 e C2 se mostrou praticamente inalterado. As razões O/C apresentaram-se suavemente maiores, mantendo o mesmo perfil anterior.

Tabela 13. Análise de XPS das polpas de celulose após extração com DCM.

Amostras	Concentração atômica/%						
	C1	C2	C3	C4	O	O/C	φ/%
Control. X	20,48	32,36	10,91	1,81	33,53	0,51	43
X₁₀	20,50	31,91	10,47	2,35	33,80	0,52	38
Control P	18,35	32,14	11,87	2,17	34,98	0,54	29
X₁₀ZP	18,11	32,61	10,75	2,23	34,84	0,55	24

Ao substituir-se os valores de O/C acima apresentados na equação 1 (Eq.1), juntamente com os valores de 0,39 para O/C da lignina e 0,83 para O/C dos carboidratos, verificou-se que os percentuais de lignina presente na superfície situaram-se entre 70 e 60% (início e fim do branqueamento, respectivamente), muito discrepantes dos valores reportados em outros estudos, sempre variando de 10% a 20% para polpas em final de branqueamento. A grande diferença observada no comportamento das polpas de eucalipto parece estar ligada ao fato de que neste estudo os valores da razão O/C apresentam-se muito baixos, tanto antes como depois da extração com diclorometano. Os valores encontrados para polpas de bétula (madeira dura) e pinus (madeira mole) em outros trabalhos apresentam valores em torno de 0,6-0,7 para polpas não branqueadas e 0,7-0,8 para as polpas branqueadas. (Laine e col., 1996a; Buchert e col, 1996). Ao substituir-se porém, o valor teórico de 0,83 para os carboidratos pelo valor de 0,60 (encontrado após submissão de uma polpa comercial de celulose branqueada à análise de XPS) são obtidos valores mais condizentes (vide tabela 13).

A dificuldade de interpretação verificada acima leva a uma reflexão sobre os tipos de transformações que podem estar ocorrendo na polpa de eucalipto durante um processo de polpação seguido de deslignificação com oxigênio e branqueamento XZP. A adaptação de um modelo utilizado principalmente no estudo de madeiras moles neste caso parece não conseguir expressar bem o comportamento das polpas de eucalipto em um processo que permite alta modificação química de grupos funcionais. Qualquer alteração nas características da xilana, ou mesmo da lignina (no estágio da pré-deslignificação), poderia influenciar a razão O/C. O isolamento da lignina após a polpação e dos carboidratos, através de extração com hidróxido de sódio após o branqueamento, talvez ajudasse para uma caracterização mais fiel à realidade das polpas.

Um exemplo de transformação química dependente do meio reacional e de grande influência nas características da polpa está relacionado à hemicelulose. Foi mostrado que a estrutura da xilana pode ser alterada durante o cozimento kraft e durante o branqueamento. Dependendo do método de cozimento até 80% dos grupos carboxílicos do ácido 4-O-metilglucurônico da xilana encontram-se sob a forma de ácidos hexenurônicos (figura 30). Durante o branqueamento com ozônio ou dióxido de cloro os grupos laterais de ácido hexenurônico foram degradados enquanto que na deslignificação por peróxido eles permaneceram retidos (Buchert e col.,1997a). Estes tipos de alterações estruturais na hemicelulose indicam ser possível a obtenção de uma polpa bem diferenciada ao final de um processo de branqueamento do tipo (O)XZP.

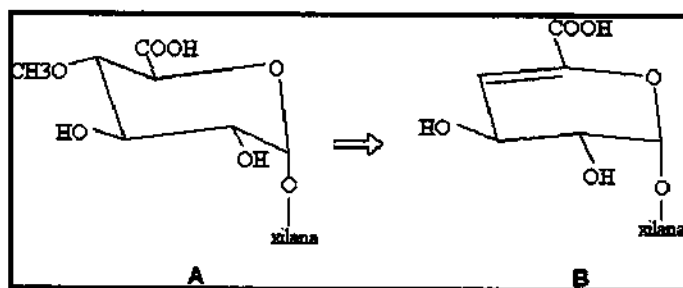


Figura 30. Transformação do ácido 4-O-metilglucurônico (A) em ácido hexenurônico (B) durante a polpação kraft.

IV 3.3 Espectroscopias de FTIR e NIR com aplicação de PCA

IV.3.3.1 FTIR

A utilização de um método de análise estatística multivariada neste trabalho teve como objetivo auxiliar o estudo do modo de ação das xilanases durante o branqueio de polpas de celulose. Apesar de muito conhecidos, os espectros de infravermelho de polpas e madeiras são extremamente complexos já que são resultado da mistura de celulose, hemicelulose e lignina.

A região mais característica apresenta-se compreendida basicamente entre 800 e 1800 cm^{-1} e apresenta bandas de estiramento e deformação principalmente de grupos C-H, C-O, O-C-O, C=O dos componentes e de anéis aromáticos da lignina, formando um conjunto de bandas largas e sobrepostas. A dificuldade na diferenciação de cada componente é portanto um fator indiscutível e piora durante o branqueamento graças às modificações químicas sofridas pela polpa e à eliminação quase que completa da lignina residual. A utilidade da aplicação da Análise de Componentes Principais estaria ligada portanto, à tentativa de procurar diferenciar polpas similares dentro de um processo de branqueamento alternativo, através da comparação de seus dados espectrais. O perfil dos espectros das polpas kraft submetidas aos branqueamentos TCF pode ser visto na figura 31.

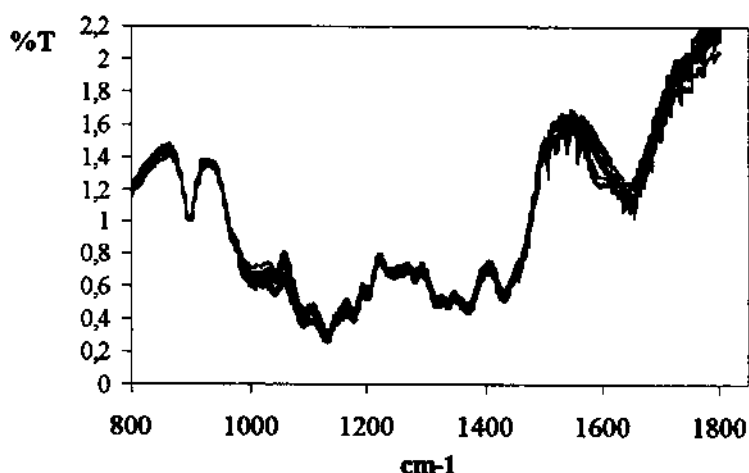


Figura 31. Espectros de DRIFT de polpas de celulose - Sequência (O)XZP.

O procedimento aplicado para Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros obtidos foi o mesmo para as duas sequências escolhidas. As matrizes formadas pelos espectros foram subdivididas em basicamente dois tipos:

A) Neste caso cada espectro correspondeu a uma amostra independente. Por exemplo: ao agrupar-se os espectros da sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático de 90 min e 50°C foi obtida uma matriz de $[]_{15 \times \text{variáveis}}$, onde 15 = n° de amostras e variáveis = cada frequência do espectro (com resolução de 2cm^{-1} ou aproximadamente 526 frequências).

B) Neste segundo caso as amostras foram caracterizadas pela soma dos espectros obtidos nos 3 estágios da sequência de branqueamento. Seguindo o exemplo acima, a matriz formada para o mesmo conjunto de espectros seria assim expressa: $[]_{5 \times \text{variáveis}}$, onde 5 = n° de amostras e variáveis = cada frequência do espectro estágio X seguida de cada frequência do espectro estágio Z e de cada frequência do espectro estágio P (ou aproximadamente 1578 variáveis). Este tipo de matriz é chamado de “unfolded”.

O estudo envolvendo os espectros no infravermelho apresentou melhores resultados quando os espectros foram analisados sob o modo de transmitância e quando foram normalizados em relação à banda centrada em 898 cm^{-1} . As figuras a seguir mostram basicamente os melhores resultados encontrados para o estudo envolvendo os dados espectrais de FTIR com aplicação de PCA.

Branqueamento XZP

A figura 32 apresenta alguns dos resultados obtidos após aplicação de PCA aos espectros das polpas submetidas ao branqueamento xilanase-ozônio-peróxido sem prévia deslignificação com oxigênio (caracterizadas no capítulo III, tabelas 6 e 7).

A melhor separação foi encontrada na análise das polpas obtidas na sequência com tratamento enzimático durante 90 minutos a 50°C. Cada espectro obtido nos diferentes estágios consistiu em uma amostra independente, podendo-se verificar basicamente uma separação do conjunto de amostras do estágio X das demais ao longo da componente

principal 2 (PC# 2 nos gráficos dos “scores”) e, ao longo de PC# 3 uma leve separação das amostras tratadas com xilanases do controle no estágio X.

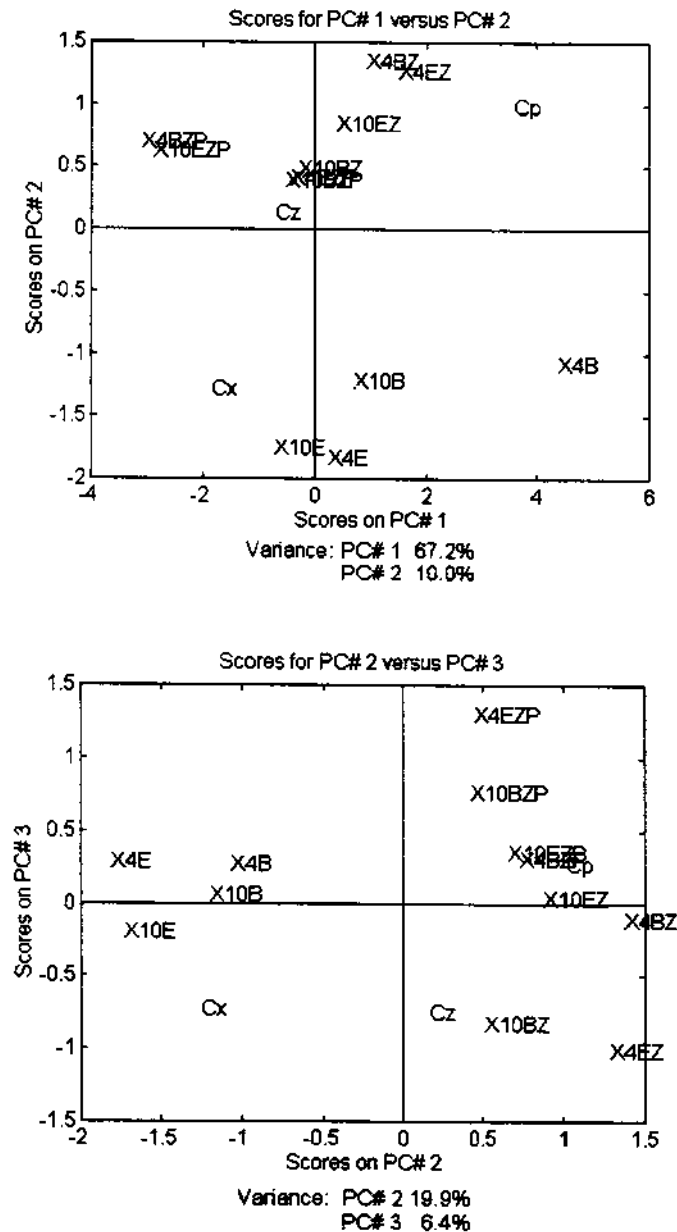


Figura 32. Gráfico de “scores” para aplicação de PCA em espectros de FTIR. Branqueamento XZP. Condições do estágio X: 90min e 50°C.

C = controles; X = amostras tratadas com xilanase; 10 e 4 = carga enzimática; B e E = enzimas induzidas por xilana de bétula e eucalipto; x, z (Z) e p (P) = estágios X, Z e P.

Observando-se os gráficos dos “loadings” na figura 33 (gráfico que apresenta a composição da variáveis do modelo estatístico) verificou-se em PC#2 uma forte

contribuição da região próxima a 1600 cm^{-1} para esta componente principal. Isto indica que as polpas com valores mais altos nesta região (maior transmitância) apresentam-se deslocadas para valores mais positivos ao longo de PC# 2, ou seja, alterações nesta região do espectro podem estar diferenciando as polpas em questão. Ao observar-se os “loadings” de PC# 3 verificou-se que a região entre 1600 e 1800 cm^{-1} apresentou maior contribuição. Infelizmente esta região do espectro é muito complexa, com bandas largas e muito ruído, indicando que a suave diferença dos espectros neste caso possa estar ligada a muitos fatores (a própria variância relacionada a esta PC# 3 é pequena, cerca de 6%).

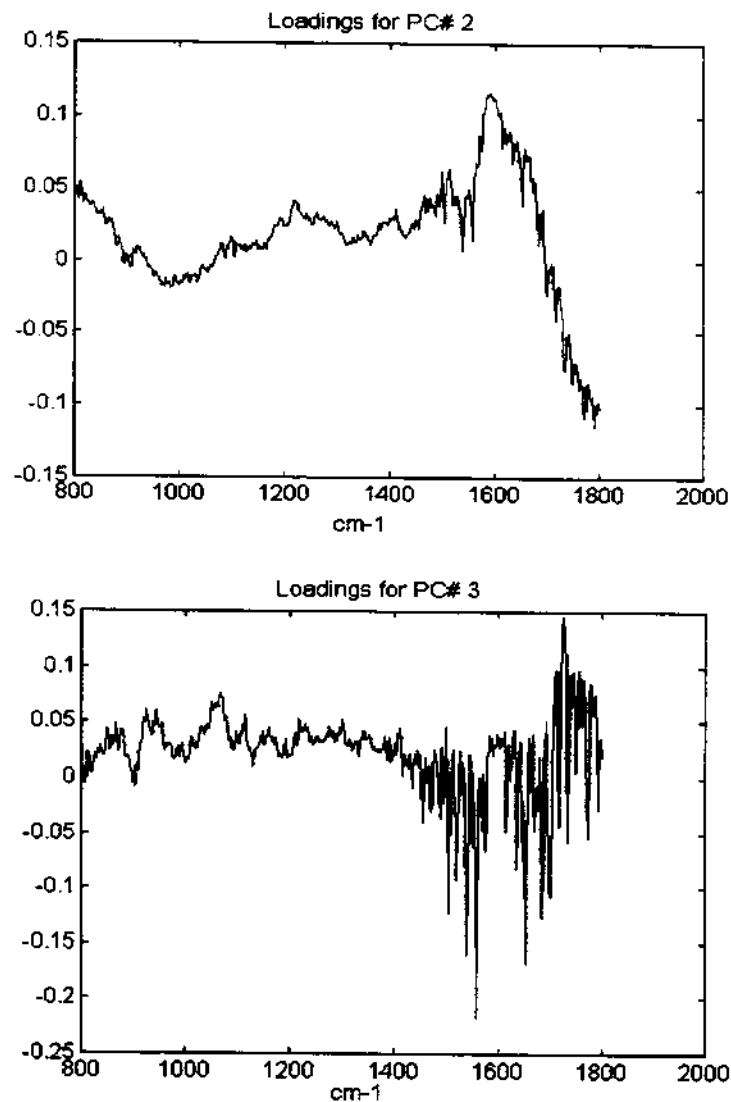


Figura 33. Gráfico dos “loadings” para as componentes principais 2 e 3. Branqueamento XZP. Condições do estágio X: 90min e 50°C .

Os mesmos espectros quando organizados em matrizes “unfolded” (tipo B) levaram a uma separação visualmente mais clara das amostras após a análise por PCA. Isto já era esperado visto que cada amostra foi caracterizada pelo conjunto dos espectros nos 3 estágios do branqueamento. Neste caso, em todas as sequências de branqueio verificou-se uma distinção entre os controles e as amostras de polpa enzimaticamente tratadas e também a separação das amostras tratadas com xilanase induzida por xilana de bétula daquelas tratadas com xilanase induzida por xilana de eucalipto (figura 34).

Os “Loadings” das componentes principais utilizadas (PC# 1 e PC# 2) em geral apresentaram um perfil semelhante, com cada estágio do branqueamento apresentando uma região de maior contribuição, sempre relativamente às regiões espectrais entre 1000 e 1200 cm^{-1} ou ao redor da região centrada em 1600 cm^{-1} . Interessante notar que a região da frequência relacionada a grupos aromáticos (1600 cm^{-1}), comumente atribuída à lignina residual, teve destaque nos “loadings” relativos à componente principal 1 (PC# 1) dos estágios de ozonização.

Branqueamento (O)XZP

As figuras seguintes apresentam os resultados da aplicação de PCA à matriz de espectros de infravermelho das polpas submetidas ao branqueamento XZP com pré-deslignificação com oxigênio (O) (capítulo III, tabelas 8 e 9).

A Figura 35 apresenta o gráfico dos “scores” de PC# 1 e PC# 2. A PC# 1 descreveu cerca de 46,3% da variância total do sistema, enquanto a PC# 2 correspondeu à 31,9% da variância. A PC3, apesar de apresentar uma variância correspondente ainda bastante alta (12,9%), quando analisada espacialmente pelo gráfico de “scores” não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao grau de informação obtido.

Observou-se a separação das amostras através de PC# 1, com as amostras referentes ao estágio do pré-tratamento enzimático situadas positivamente ao longo de PC1 enquanto que as demais foram deslocadas para “scores” mais negativos. Analisando os gráficos dos “loadings” para esta componente principal (figura 36) observou-se que duas regiões espectrais, correspondente às bandas entre 1000 e 1200 cm^{-1} e à banda de 1600 cm^{-1} , tiveram uma contribuição negativa dentro desta componente.

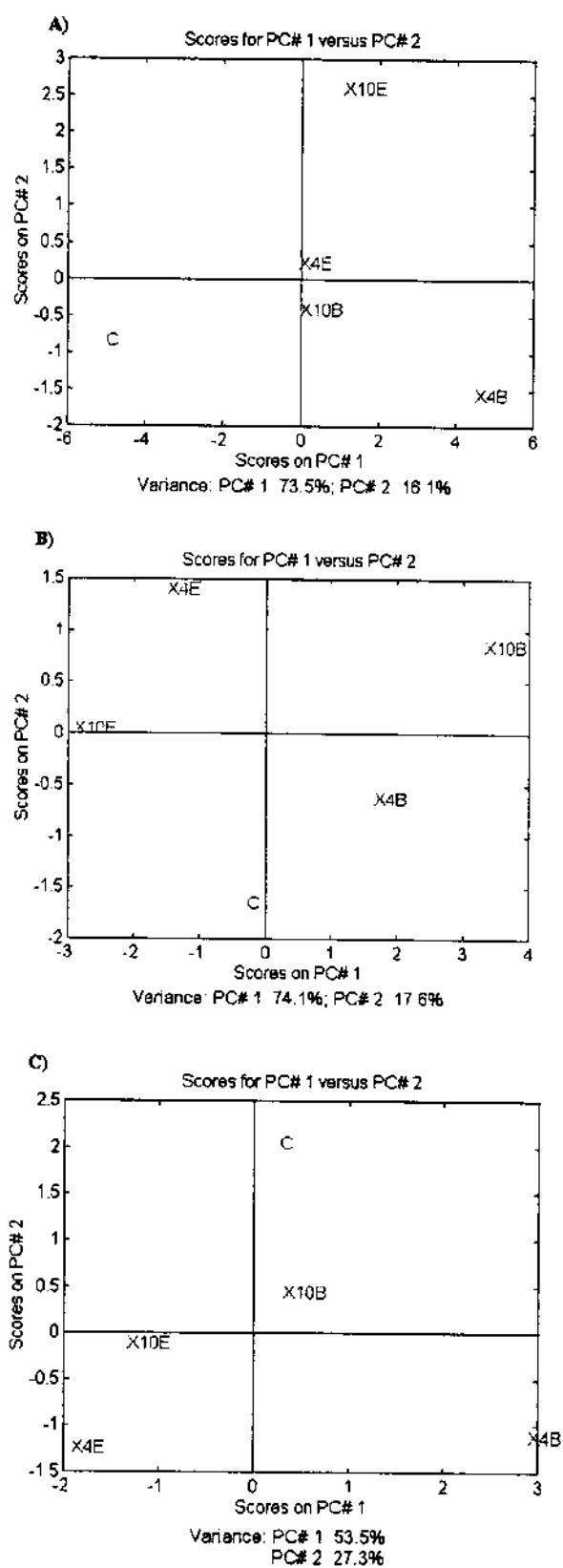


Figura 34. Análise dos espectros das sequências XZP através de PCA “unfolded”.

A) Estágio X: 90 min e 50°C. B) Estágio X: 180 min e 50°C. C) Estágio X: 12 h e 40°C.

C= controles e X= tratamento com xilanase; 10 e 4 = carga de enzima; B e E= bétula e eucalipto.

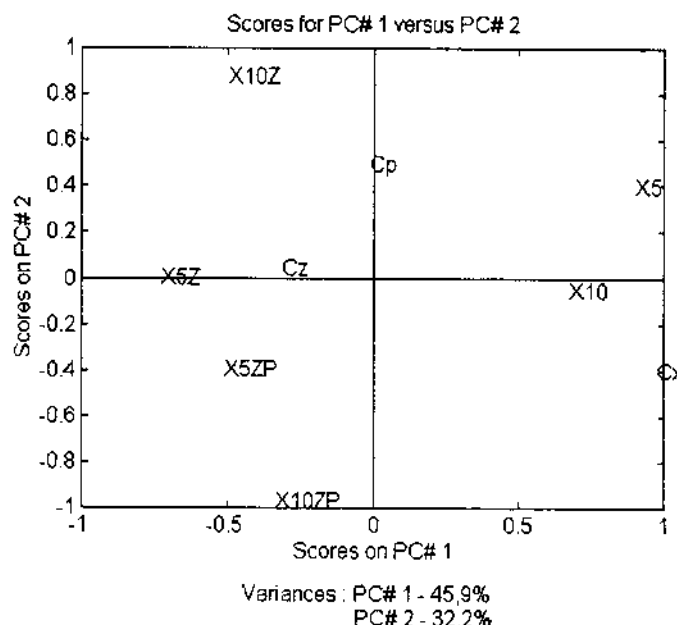


Figura 35. Gráfico de “scores” para aplicação de PCA aos espectros de FTIR. Braqueamento XZP com pré-deslignificação com oxigênio – (O)XZP.

C = controles; X = amostras tratadas com xilanase; 10 e 5 = carga enzimática; x, z (Z) e p (P) = estágios X, Z e P.

Com base nos resultados apresentados nas Figuras 35 e 36 pôde-se observar que a separação das amostras ao longo de PC1 foi dependente das frequências de absorção tanto dos carboidratos como de lignina. Assim, as amostras com maior deslocamento para “scores” negativos foram, provavelmente, as que apresentaram valores mais altos nas regiões espectrais acima citadas (na prática isto significa uma maior transmitância). Este fato pode estar ligado à perda de lignina e/ou despolimerização de celulose e hemicelulose em relação às amostras com “scores” positivos (as amostras deslocadas negativamente em PC# 1 apresentariam menor absorção no infravermelho em relação ao material lignocelulósico e são, justamente, as mais deslignificadas e com maior perda na viscosidade devido ao efeito do tratamento enzimático). É importante salientar que este tipo de correlação encontrada é de natureza qualitativa e não quantitativa.

A diferenciação ao longo de PC# 2 (figura 35) propiciou uma separação das amostras do estágio X submetidas ao tratamento enzimático de seu controle, observando-se um deslocamento para “scores” mais positivos. Através do gráfico de “loadings” da segunda componente principal (figura 36) observou-se que a única região cuja contribuição para a

PC# 2 se mostrou não negativa correspondeu às frequências de absorção dos carboidratos (ao redor de 1200cm^{-1} aproximadamente). Aparentemente, as maiores diferenças observadas estariam ligadas ao balanço da celulose e hemicelulose.

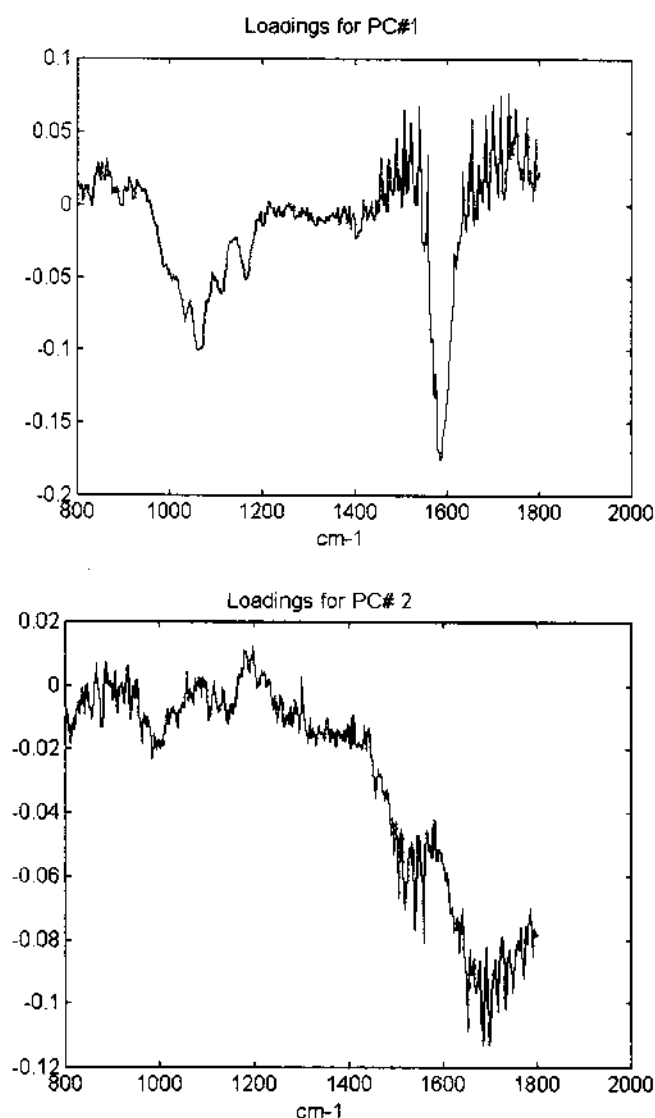


Figura 36. Gráfico dos “loadings” para as componentes principais 1 e 2. Branqueamento XZP com pré-deslignificação com oxigênio – (O)XZP.

Na figura 37 é possível observar-se a diferença entre as amostras enzimaticamente tratadas e o controle da sequência de branqueamento, através da aplicação de PCA a uma matriz “unfolded” (tipo B). Os gráficos de “loadings” neste caso, representam a composição das variáveis para cada componente principal (PC#), sendo uma somatória dos 3 estágios do

branqueamento. No caso da PC# 1, que diferencia o controle das amostras tratadas com xilanase, observou-se que as regiões com maior contribuição para os “loadings” foram: ao redor de 1100 e 1600 cm^{-1} para o estágio X, 1000-1200 cm^{-1} no estágio Z e 1600 cm^{-1} para o estágio P.

Para a componente principal 2 (PC# 2) do estudo acima, que distingue as duas amostras enzimaticamente tratadas, os “loadings” apresentaram uma contribuição mais significativa na região dos carboidratos (1000-1200 cm^{-1}) no estágio de ozonização.

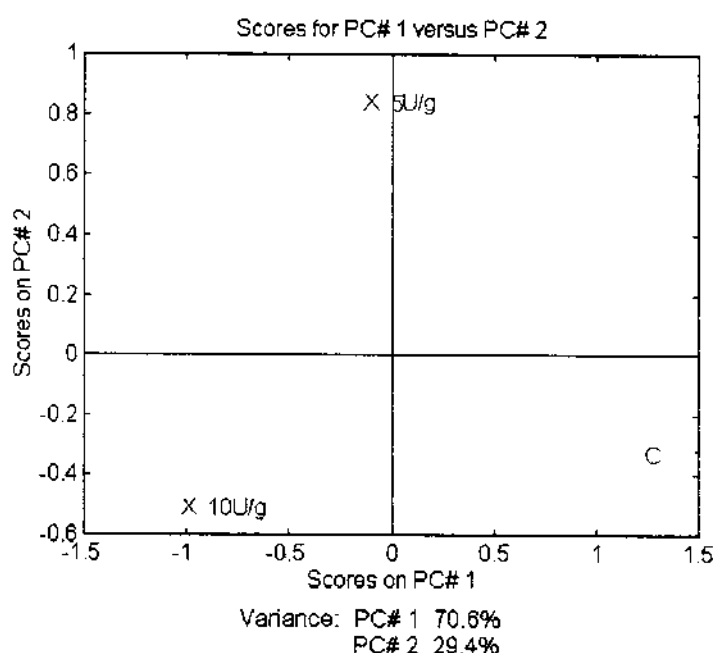


Figura 37. Gráfico de “scores” na aplicação de PCA “unfolded” aos espectros de FTIR. Branqueamento XZP com pré-deslignificação com oxigênio – (O)XZP.

C= controles e X= amostras tratadas com xilanase para todo o processo; 10 e 5 = carga de enzima

Comparação entre as sequências XZP e (O)XZP:

Com base nos resultados encontrados, foi realizado um estudo comparativo entre a sequência de branqueamento XZP com estágio enzimático de 90 minutos e 50°C (apenas amostras tratadas com xilanase induzida por xilana de bétula) e a sequência de branqueamento (O)XZP (também com xilanase induzida por xilana de bétula, vide capítulo III), através da aplicação de PCA aos respectivos espectros de FTIR. Os resultados apresentaram uma boa separação entre as duas sequências (principalmente nos estágios X e

Z), evidenciando o efeito da pré-deslignificação com oxigênio, e também uma distinção entre as amostras enzimaticamente tratadas dos seus controles, que se mostrou mais acentuada na sequência XZP (figura 38).

IV.3.3.2 NIR

O perfil dos espectros de NIR obtidos neste estudo podem ser vistos na figura 39.

A observação dos gráficos de “loadings” não foi realizada, visto que os “loadings” obtidos não puderam contribuir satisfatoriamente para um melhor entendimento da análise espectroscópica por NIR. Isto porque, além da técnica ser sensível somente aos grupos específicos O-H, N-H, C-H e C-O (Workman, 1996), para um bom ajuste da linha base foi necessário a transformação de cada espectro analisado em sua primeira derivada, tornando-o ainda mais complexo. Talvez uma alternativa futura para melhorar a análise seja a seleção de comprimentos de onda dos espectros a intervalos regulares, apesar dos trabalhos da literatura concordarem que este tipo de caracterização através dos “loadings” deva ser muito cauteloso (Michell, 1995; Schimleck e col., 1996).

Branqueamento XZP e (O)XZP.

As figuras a seguir apresentam os resultados encontrados na análise dos espectros no infravermelho próximo através de PCA. De um modo geral, quando os espectros foram reunidos em matrizes do tipo A, a melhor diferenciação encontrada para as amostras foi a separação em três grupos muito homogêneos, correspondentes respectivamente aos três estágios do branqueamento (como os resultados foram idênticos para as três sequências estudadas - 90min e 50°C, 180min e 50°C, 12h e 40°C - a figura 40 apresenta apenas um exemplo deste caso). Isto indicou que as alterações ocorridas na polpa de celulose durante o processo de branqueio puderam ser detectadas com boa sensibilidade pela técnica de NIR, embora as amostras dentro de cada estágio sejam muito similares.

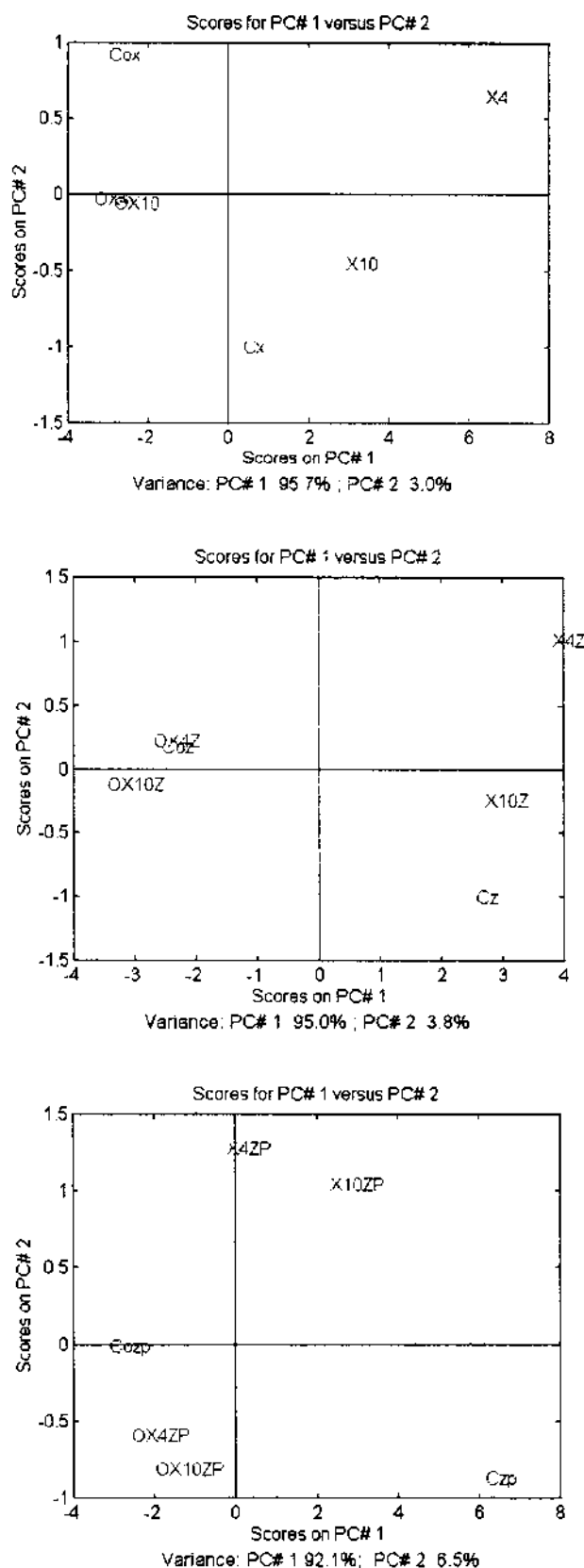


Figura 38. Comparação entre as seqüências de branqueamento XZP e (O)XZP. Utilização de espectroscopia de FTIR e análise de componentes principais. Estágio X (acima), estágio Z (ao centro) e estágio P (abaixo).

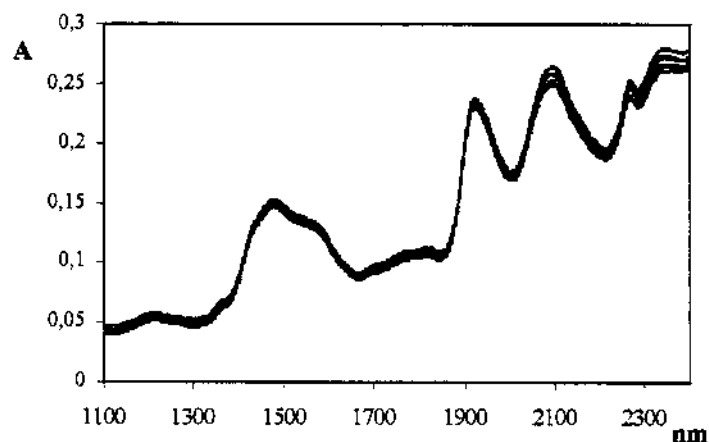


Figura 39. Espectros de NIR de polpas de celulose – Sequência (O)XZP.

A figura 41 apresenta os resultados da análise dos espectros de NIR quando matrizes do tipo B foram construídas. Neste caso pôde-se observar uma distinção das amostras enzimaticamente tratadas das amostras controle, embora os espectros no infravermelho próximo obtidos se apresentassem muito similares. A análise através da aplicação de PCA permite a suposição, portanto, que este comportamento distinto das amostras esteja relacionado a alterações bastante sutis ocasionadas pelo tratamento com xilanases.

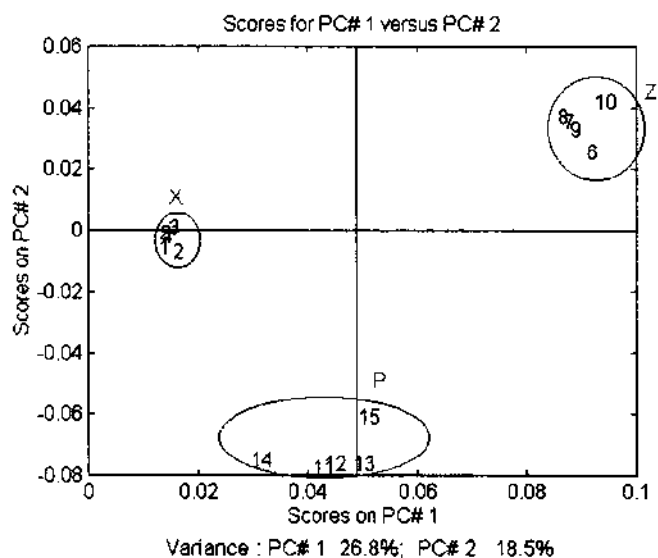


Figura 40. Gráfico de “scores” da análise PCA/NIR - XZP (X: 90min e 50°C).
1,2,3,4 e 5 = X4B, X10B, X4E, X10E e C; 6,7,8,9 e 10 = idem, estágio Z e 11,12,13,14 e 15 = idem, estágio P.

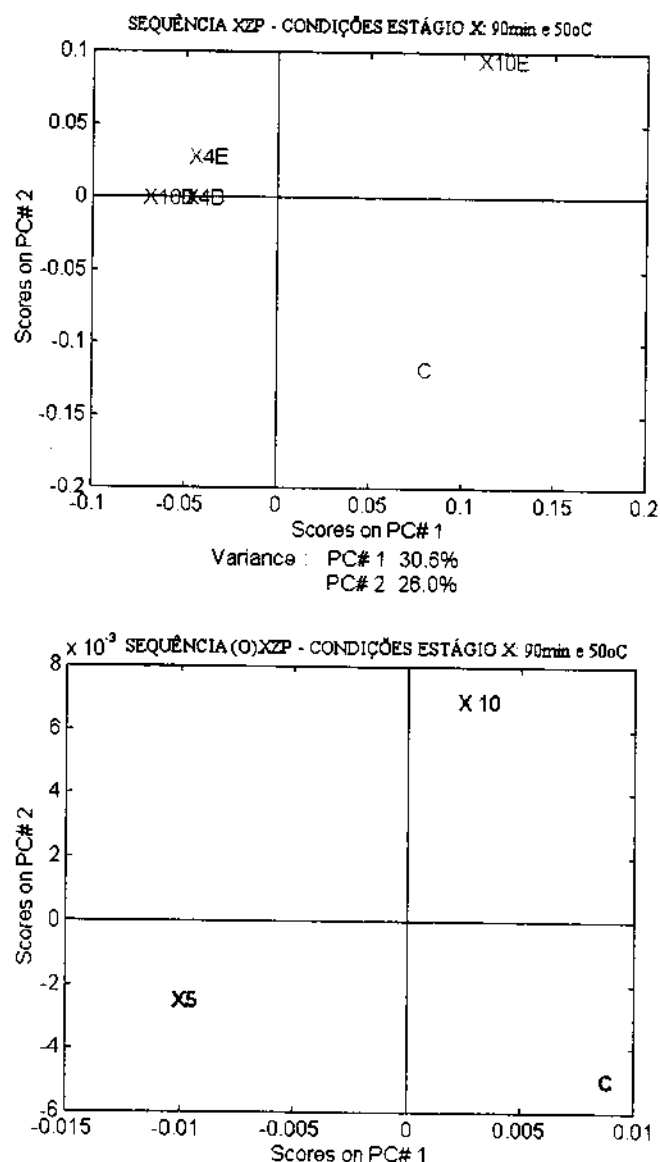


Figura 41. Gráfico de “scores” da aplicação de PCA aos espectros de NIR de polpas de celulose submetidas ao branqueamento TCF (matriz “unfolded”).
Acima = branqueamento XZP e abaixo = branqueamento (O)XZP.

Na análise exploratória dos espectros de FTIR e NIR através de PCA fica evidente que a distinção espacial das amostras, relacionada às diferenças químicas da superfície das polpas, é mínima e difícil de interpretar. Apesar das dificuldades, os resultados encontrados permitiram ampliar a utilização destas técnicas espectroscópicas como ferramentas de caracterização de polpas de celulose durante sequências de branqueamento e indicaram que

um estudo mais profundo pode melhorar o nível de sensibilidade e informação desta metodologia.

IV.4 Conclusões

✎ A caracterização das polpas de celulose através de técnicas de análise de superfícies mostrou que, em alguns casos, os métodos não possuem sensibilidade suficiente (como RMN ou MET) para detecção das transformações ocorridas em consequência do tratamento enzimático ou do próprio branqueamento.

✎ Na caracterização morfológica da superfície observou-se que a técnica de maior contribuição para análise das polpas continua sendo a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Entretanto, os estudos conduzidos através de microscopia de força atômica (MFA) indicaram que a técnica possui um potencial ainda inexplorado nessa área e que, graças ao seu grau de sensibilidade, poderá tornar-se muito útil num futuro próximo.

✎ O estudo realizado através de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS) mostrou que a técnica pode ser de grande utilidade na caracterização de polpas de celulose, indicando possuir sensibilidade adequada para sua utilização em análises de polpas submetidas ao branqueamento. Ainda é necessário contudo, um estudo exaustivo de polpas de *Eucalyptus grandis* a fim de que sejam estabelecidos os parâmetros de caracterização deste tipo de amostra.

✎ A aplicação de métodos estatísticos de análise multivariada (no caso específico, análise de componentes principais – PCA) aos resultados das análises espectroscópicas de infravermelho e infravermelho próximo mostrou-se apropriada, indicando que amostras muito similares podem ser caracterizadas e distintas através deste procedimento.

✎ Os resultados das análises de superfícies, em conjunto, indicaram que o tratamento enzimático altera a superfície das polpas, sendo que as diferenças encontradas devem estar muito mais relacionadas à características estruturais dos carboidratos do que à provável eliminação de lignina no decorrer do branqueamento.

CAPÍTULO V

Conclusão final

V. Conclusão final

Os resultados encontrados no desenvolver deste trabalho permitiram observar a extrema complexidade do estudo do modo de ação de xilanases através da caracterização de polpas de celulose, principalmente durante o branqueamento. Embora alguns efeitos da aplicação da enzima sejam bem aparentes, a detecção das suas causas a nível molecular não é simples. Dois fatores parecem estar ligados a este obstáculo: a composição majoritária crescente de celulose no decorrer do processo e a grande similaridade dos grupos químicos dos componentes lignocelulósicos das polpas.

Outros fatores que devem influenciar intensamente o comportamento das polpas frente à ação da enzima são os processos de polpação e branqueamento escolhidos. A composição das polpas, aliada aos processos de polpação e branqueamento bastante agressivos, permite supor que as fibras podem sofrer constantes modificações durante a deslignificação e, desse modo, apresentar alterações significativas tanto na lignina residual como na hemicelulose. Neste caso especificamente, pode-se supor que sequências de branqueamento TCF provocam grandes alterações estruturais às polpas durante o branqueamento.

Neste contexto, o modo de ação da xilanase, e consequentemente seu efeito nas características das polpas durante o branqueamento, parece estar intimamente ligado a estas alterações. A hidrólise enzimática da xilana deve, portanto, ajudar na deslignificação e branqueamento das polpas não somente por aumentar a porosidade da fibra mas também por atuar na modificação ou eliminação de possíveis grupos cromóforos presentes na própria hemicelulose, provenientes de modificações das fibras durante a polpação e a pré-deslignificação com oxigênio. Um indicativo de tal comportamento pode estar relacionado ao efeito cooperativo entre xilanase e outras enzimas (neste caso a glucuronidase) na degradação a xilana. Este tipo de ação da enzima poderá, consequentemente, influenciar nas características finais das polpas nos estágios subsequentes do branqueamento.

Para finalizar, os resultados aqui verificados, em conjunto com todo levantamento da literatura sobre o assunto, indicam que o modo de ação da enzima não ocorre necessariamente por uma via única dentro de um processo de branqueamento, mostrando-se intensamente dependente da origem da polpa, do tipo de polpação e da sequência de branqueamento escolhida.

Atividades desenvolvidas no período

Estágio no exterior: Laboratório de Recursos Renováveis, Universidade de Concepción - Concepción, Chile - nov.96/jan.97.

Apresentação oral em congresso: "Utilização de Hemicelulases em Sequência de Branqueamento de Polpas Kraft Totalmente Livre de Cloro". Workshop de Doutorandos - II Sem. Nac. Tecnologia Enzimática - ENZITEC, Rio de Janeiro - RJ, out., 1995.

Seminários: "Determinação de Hidroxilas Fenólicas e Lignina Total de Madeiras e Polpas por FTIR e Métodos de Calibração Multivariada". Centro de Pesquisa e Tecnologia - Aracruz Celulose S.A., Aracruz - ES, jul., 1996.

Atividade Docente: Estagiária de Capacitação Docente - PECD Unicamp, Disciplina QO622 - Química Orgânica Experimental, julho/novembro, 1997.

Trabalho Apresentado em Congresso Nacional

De Toledo, A.R.; Angelo, R.; Aguirre, C.; Curotto, E.; Esposito, E.; Milagres, A.M.F.; Durán, N. "Hemicelulases profile of *Aspergillus* sp 2M1 induced by birchwood and oat spelt xylans". V Sem. Hidrólise Enzimática de Biomassa - SHEB, Maringá - PR, dez, 1996.

Trabalhos apresentados em congressos Internacionais

De Toledo, A.R.; Angelo, R.; Esposito, E.; Machuca, A.; Curotto, E.; Durán, N. "Hemicelulolytic Complex from *Aspergillus* sp (2M1 Strain)". 4th Braz. Sym. Chem. Lignins and Other Wood Comp., Recife - PE, ago., 1995.

Angelo, R.; Esposito, E.; Curotto, E.; Soen, U.M.; Baeza, J.; Freer, J.; Durán, N. "TCF Eucalyptus Kraft Pulp: Effect of Asperzyme 2M1 on Bleaching and Its Effluent Bioremediation with *Lentinula edodes*". 4th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., Recife - PE, ago., 1995.

Angelo, R.; Ruiz, J.; Freer, J.; Baeza, J.; Durán, N. "Mode of Action of *Aspergillus* sp (2M1) Xylanase on TCF Bleaching Sequence". 5th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., Curitiba - PR, set., 1997.

Durán, N.; de Toledo, A.R.; Milagres, A.M.F.; Esposito, E.; Curotto, E.; Angelo, R. - "Cooperative Effect of β -Xylanase and α -Glucuronidase on *Eucalyptus grandis* Kraft Pulp Bleaching". 5th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., Curitiba - PR, set., 1997.

Angelo, R.; Durán, N. "Xylanase-aided TCF bleaching of *Eucalyptus grandis* Kraft Pulp: Comparative Study of pre- and non- Oxygenated pulps". 7th Int. Conf. Biotechnol. Pulp Pap. Ind., Vancouver-Canada, jun., 1998.

Angelo, R.; Durán, N. "Characterization of Xylanase-aided TCF bleaching of *Eucalyptus grandis* Kraft pulps by XPS, FTIR and NIR Spectroscopies". 5th European Workshop on Lignocell. and Pulp. (escolhido para apresentação oral), Aveiro-Portugal, set., 1998.

Trabalhos publicados em anais

Angelo, R.S.; Aguirre, C.; Curotto, E.; Durán, N. "Utilização de Hemicelulases em Sequência de Branqueamento Totalmente Livre de Cloro." Proc. II Sem. Nac. Tecnologia Enzimática - ENZITEC, vol. II, (pp.4), 1995.

De Toledo, A.R.; Angelo, R.; Esposito, E.; Machuca, A.; Durán, N. "Hemicellulolytic complex from *Aspergillus* sp (2M1 strain) for Pulp Biobleaching." Proc. 4th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., Recife-PE, vol. V, 161-163, 1995.

Angelo, R.; Esposito, E.; Curotto, E.; Sacon, V.M.; Baeza, J.; Freer, J.; Durán, N. "TCF Eucalyptus Kraft Pulp: Effect of Asperzyme 2M1 on Bleaching and its Effluents Bioremediation with *Lentinula edodes*", Proc. 4th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., Recife-PE, vol. V, 210-214, 1995.

Angelo, R.; Ruiz, J.; Freer, J.; Baeza, J. e Durán, N. - "Mode of Action of *Aspergillus* sp (2M1) Xylanase on TCF Bleaching Sequence." Proc. 5th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., vol. VI, 537-546, 1997.

Durán, N.; de Toledo, A.R.; Milagres, A.M.F.; Esposito, E.; Curotto, E.; Angelo, R. - "Cooperative Effect of β -Xylanase and α -Glucuronidase on *Eucalyptus grandis* Kraft Pulp Bleaching." Proc. 5th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., vol. VI, 430-437, 1997.

Angelo, R.; Durán, N. "Xylanase-aided TCF bleaching of *Eucalyptus grandis* Kraft Pulp: Comparative Study of pre- and non- Oxygenated pulps". Proc. 7th Int. Conf. Biotechnol. Pulp Pap. Ind., Vol. 7C, 19-22, 1998.

Angelo, R.; Durán, N. "Characterization of Xylanase-aided TCF bleaching of *Eucalyptus grandis* Kraft pulps by XPS, FTIR and NIR Spectroscopies". Proc. 5th European Workshop on Lignocell. and Pulp., 505-508, 1998.

Alderete, J.B.; Fardim, P.; Angelo, R.; Fujiwara, F.; Durán, N. "A C-CPMAS and dipolar dephasing study of lignin in kraft pulp and wood from *Eucalyptus grandis*." Proc. 5th European Workshop on Lignocell. and Pulp., 93-96, 1998.

Publicação em periódico nacional

Angelo, R.; Milagres, A.M.F.; Tesdke, O.; de Castro, S.G.C.; Wegener, G.; Stoll, M.; Windeisen, L. e Durán, N. "Estudos Preliminares sobre Caracterização de Polpas de Celulose Através de Técnicas de Análise Química de superfícies." O Papel, abril, 63-70, 1998.

Publicações em periódicos internacionais

Angelo, R.; Aguirre, C; Curotto, E.; Esposito, E.; Milagres, A.M.F.; Fontana, J.D.; Durán, N. "Stability and Chemical Modification of Xylanase from *Aspergillus* sp(2M1 strain)". Biotechnol. Appl. Biochem., 25:19-27, 1997 .

Durán,N.; Angelo, R. "Infrared Microspectroscopy in the Pulp and Paper Making Industry." Appl. Spectrosc.Rev., 33: 219-236, 1998.

Ruiz, J.; Angelo, R.; Freer, J.; Baeza, J.; Durán, N. "Xylanase stability in methanol and its TCF bleaching capacity on kraft pre-oxygenated *Pinus radiata* D Don pulp." Biotechnol. Lett., submetido – nov., 1998.

Angelo, R.; Durán, N. "Xylanase-aided TCF bleaching of *Eucalyptus grandis* Kraft Pulp: Comparative Study of pre- and non- Oxygenated pulps by chemical analysis and FTIR and NIR spectroscopies." APPITA J., submetido – fev., 1999.

Referências Bibliográficas

- Alderete, J.B.; Fardim, P.; Angelo, R.; Fujiwara, F.; Durán, N. "C-CPMAS and dipolar dephasing study of lignin in kraft pulp and wood from *Eucalyptus grandis*." Proc. Eur. Workshop on Lignocell. and Pulp, Aveiro – Portugal, setembro, 93-96, 1998.
- Allison, R. W.; Clark, T. A.; Ellis, M.J. "Process effects on the response of softwood kraft pulp to enzyme assisted bleaching." APPITA J., 48: 201-206, 1995.
- Allison, R. W.; Clark, T. A.; Suurnakii, A. "Effect of modified kraft pulping on enzyme assisted bleaching." APPITA J., 49: 18-22, 1996.
- Angelo, R.S. "Xilanases de *Aspergillus sp* 2M1: produção, caracterização e aplicação no branqueamento de polpas kraft." Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – S.P., Brasil, abril, 1995.
- Angelo, R.; Esposito, E.; Curotto, E.; Sacon, V.M.; Baeza, J.; Freer, J.; Durán, N. "TCF eucalyptus kraft pulp: effect of Asperzyme 2M1 on bleaching and its effluents bioremediation with *Lentinula edodes*", Proc. 4th Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp., vol.V, Recife-PE, 210-214, 1995.
- Angelo, R.; Aguirre, C.; Curotto, E.; Esposito, E.; Fontana, J.D.; Baron, M.; Milagres, A.F.M.; Durán, N. "Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus sp.* (2M1 strain)." Biotechnol. Appl. Biochem., 25: 19-27, 1997.
- Angelo, R.S.; Durán, N. "Xylanase-aided TCF bleaching of *Eucalyptus grandis* kraft pulp: Comparative study of pre- and non-oxygenated pulps." Proc. 7th Int. Conf. on Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry, vol.7 C, 19-22, 1998.
- Antti, H.; Sjostrom, M.; Wallbacks, L. "Multivariate calibration models using NIR spectroscopy on pulp and paper industrial applications." J. Chemom., 10: 591-603, 1996.
- Aumont, M.; Vegaga, A.; Elm, D.D.; Choma, P.P. "Low kappa factor bleaching of oxygen delignified hardwood kraft pulp xylanase and peroxide applications" Pulp Pap. Can., 97: 72-76, 1996.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity." J. Biotechnol., 23: 257-270, 1992.
- Bajpai, P.; Bhardwaj, N.K.; Maheshwari, S.; Bajpai, P.K. "Use of xylanase in bleaching of *Eucalyptus* kraft pulp" . APPITA J., 46: 274-276, 1993.
- Barrasa, J.M.; González, A.E.; Martinez, A.T. "Ultrastructural aspects of fungal delignification of chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysocrea*." Holzforschung, 46: 1-8, 1992.
- Belgagem, M.N.; Czeremuszkin, G.; Sapieha, S. "Surface Characterization of Cellulose Fibres by XPS and Inverse Gas Chromatography." Cellulose, 2: 145-157, 1995.

- Biely, P.; Vrsanska, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D. "Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties." J.Biotechnol. 57: 151-166, 1997.
- Blanchette, R.A.; Obst, J.R.; Timell, T.E. "Biodegradation of compression wood and tension by white and brown rot fungi." Holzforschung, 48: 34-42, 1994.
- Breccia, J.D.; Torto, N.; Lo Gorton, L.; Siñeriz, F.; Hatti-Kaul, R. "Specificity and mode of action of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. On-line monitoring of hydrolysis products." Appl. Biochem. Biotechnol., 69: 31-40, 1998.
- Brunner, M.; Eugster, R.; Trenka, E.; Bergamin-Strotz, L. "FT-NIR spectroscopy and wood identification." Holzforschung, 50: 130-134, 1996.
- Buchert, J.; Tenkanen, M.; Kantelinen, A.; Viikari, L. "Application of xylanases in the pulp and paper Industry." Bioresource Technol., 50: 65-72, 1994.
- Buchert, J.; Viikari, L. "Significance of pulp metal profile on enzyme-aided TCF bleaching." Pap.Puu – PapTimb., 77: 582-587, 1995.
- Buchert, J.; Teleman, A.; Harjunpaa, V.; Tenkanen, M.; Viikari, L.; Vuorinen, T. "Effect of cooking and bleaching on the structure of xylan in conventional kraft pulp." TAPPI J., 78: 125-130, 1995a.
- Buchert, J.; Kantelinen, A.; Suurnakki, A.; Viikari, L.; Janson, J. "Evaluation of the effects of hemicellulases on the bleachability of sulfite pulps." Holzforschung, 49: 439-444, 1995b.
- Buchert, J.; Carlsson, G.; Viikari, L.; Strom, G. "Surface characterization of unbleached kraft pulps by enzymic peeling and ESCA." Holzforschung, 50: 69-74, 1996.
- Buchert, J.; Bergnor, L. G.; Viikari, L.; Ek, M. "Significance of xylan and glucomannan in the brightness reversion of kraft pulps." TAPPI J., 80: 165-171, 1997a.
- Buchert, J.; Tamminen, T.; Viikari, L. "Impact of Donnan effect on the action of xylanases on fibre substrates." J. Biotechnol., 57: 217-222, 1997b.
- Cadet, F.; Pin, F.W.; Rouch, C.; Robert, C.; Baret, P. "Enzyme kinetics by mid-infrared spectroscopy. Beta-fructosidase study by one step assay." Biochim.Biophys. Acta, 1246: 142-150, 1995.
- Castro e Silva, A.; Esposito, E.; Ferraz, A. e Durán, N. "Decay of *Parkia opositifolia* in Amazonia by *Pycnoporus sanguineus* and potencial use for effluent decolorization." Holzforschung, 47: 361-368, 1993.
- Chen, C-C.; Adolphson, R.; Westpheling, J. "Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritima*." Enzyme Microb. Technol., 20: 39-45, 1997.
- Chinnaraj, S.; Rajesh, K.S.; Rao, N.R.M. "Xylanase production and its impact on bleaching of hardwood pulp." Curr. Sci., 72: 111-112, 1997.

- Chirat, C.; Lachenal, D. "Effect of ozone on pulp components. Application to bleaching of kraft pulps." Holzforschung, 48: 133-139, 1994.
- Christov, L.P.; Prior, B.A. "Research in biotechnology for the pulp and paper industry in South Africa." S. Afr. J. Sci., 94: 195-200, 1998.
- Clark, T.A.; Allison, R.W. "Characterization of process effects in enzyme-assited bleaching." Proc. 6th Int. Conf. Biotechnol. Pulp Pap. Ind., Srbotnik, E. & Messner, K. eds., Vienna, Austria, 81-86, 1996.
- Clark, T.A.; Steward, D.; Bruce, M.; McDonald, A.; Singh, A. e Senior, D. "Improved bleachability of *Radiata* pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes." APPITA J., 44: 389-393, 1991.
- Coughlan, M.P.; Hazlewood, G.P. " β -1,4-D-xylan degrading enzymes systems: biochemistry molecular biology and applications." Biotechnol. Appl. Biochem., 17: 259-289, 1993.
- Curotto, E.; Aguirre, C.; Concha, M.; Nazal, A.; Campos, V.; Esposito, E.; Angelo, R.; Milagres, A.M.F.; Durán, N. "New methodology for fungal screening: Xylanolytic enzymes." Biotechnol. Tech., 7: 821-822, 1993.
- Curotto, E.; Nazal, A.; Aguirre, C.; Campos, V.; Durán, N. "Enzymatic pretreatment of kraft pulps from *Pinus radiata* D Don with xylanolytic complex of *Penicillium canescens* (CP1) fungi." Appl. Biochem. Biotech., 73: 29-42, 1998.
- de Castro, S.G.C. "Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X." Apostila de laboratório, Instituto de Física G. W., Universidade Estadual de Campinas – Campinas, S.P., Brasil, 1996.
- De Jong, E.; Wong, K.K.Y.; Saddler, J.N. "The mechanism of xylanase prebleaching of kraft pulp. An examination using model pulps prepared by depositing lignin and xylan on cellulose fibers." Holzforschung, 51: 19-26, 1997.
- Durán, N.; Esposito, E.; Neto, J.S.A. "Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel." O papel, 12: 68-85, dez., 1995.
- Durán, N. "Recentes desenvolvimentos da utilização de enzimas na indústria de papel e celulose." Conferência SHEB-96 (Semin. Nac. Hid. Enzim. Biomassa), Maringá -PR, Dez., 1996.
- Durand, R.; Rasclé, C.; Fevre, M. "Molecular characterization of xyn3, a member of the endoxylanase multigene family of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*." Curr. Genetics, 30: 531-540, 1998.
- Elegir, G.; Sykes, M.; Jeffries, T.W. "Differential and synergistic action of *Streptomyces* endoxylanases in prebleaching of kraft pulps." Enzyme Microbiol. Technol., 17: 954-959, 1995.
- Evtuguin, D.V.; Neto, C.P.; Silvestre, A. J-D. "Condensation reactions of lignin during oxygen delignification under acidic conditions." J. Wood Chem. Technol., 17: 41-55, 1996.

- Faix, O.; Bottcher, J.H. "Determination of phenolic hydroxyl group content in milled wood lignins by FTIR spectroscopy applying partial least squares (PLS) and principal component regression (PCR)." Holzforschung, 47: 45-49, 1993.
- Faix, O.; Grunwald, C.; Beinhoff, O. "Determination of phenolic hydroxyl group content in milled wood lignins (MWL's) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, ¹H NMR and UV spectroscopy." Holzforschung, 46: 425-432, 1992.
- Froass, P.M.; Ragauskas, A.J.; Jiang, J. "NMR studies part 3: Analysis of lignins from modern kraft pulping technologies." Holzforschung, 52:385-390, 1998a.
- Froass, P.M.; Ragauskas, A.J.; Jiang, J. "Nuclear magnetic resonance studies 4: Analysis of residual lignin after kraft pulping." Ind. Eng. Chem. Res., 37: 3388-3394, 1998b.
- Furhmann, A.; Li, X-L.; Rautonen, R.; Toikkanen, L.; Hausalo, T.; Sagfors, P-E. "Influence of TCF and ECF bleaching chemicals on softwood kraft pulp components." Pap. Puu - Pap Timb., 78: 172-176, 1996.
- Furuta, T.; Gray, D.G. "Direct force-distance measurements on wood-pulp-fibres in aqueous media." J.Pulp Pap. Sci., 24: 320-324, 1998.
- Garg, A.P.; Roberts, J.C.; McCarthy, A.J. "Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp." Enzyme Microb. Technol., 22: 594-598, 1998.
- Genesse, A.; Mamo, G. "Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus sp* AR-135." J.Ind. Microbiol.Biotechnol., 20:210-214, 1998.
- Gilardi, G.; Abis, L.; Cass, E.G. "Wide-Line solid-state NMR of wood: proton relaxation time measurements on cell walls biodegraded by White-Rot and Brown -Rot fungi." Enzyme Microb. Technol., 16: 676-682, 1994.
- Gilardi, G.; Abis, L.; Cass, E.G. "Carbon-13 CP/MAS solid-state NMR and FTIR spectroscopy of wood cell wall biodegradation." Enzyme Microb. Technol., 17: 268-275, 1995.
- Goldschmidt, O. Em: "Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Ultraviolet Spectra." Sarkanen, K.V.; Ludwig, C.H., John Wiley & Sons, N.Y., 258-259, 1971.
- Gubitz, G.M.; Schnitzhofer, W.; Balakrishnan, H.; Steiner, W. "Two mannanases from *Sclerotium rolfsii* in total chlorine free bleaching of softwood kraft pulp." J. Biotechnol., 50: 181-188, 1996.
- Gubitz, G.M.; Haltrich, D.; Latal, B.; Steiner, W. "Mode of depolymerization of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp." Appl. Microbiol. Biotechnol., 47: 658-662, 1997.
- Hamilton, J.; Senior, D.; Rodriguez, A.; Santiago, D.; Szwec, J.; Ragauskas, A.J. "Improvements in ECF bleaching: use of activated species and xylanase." TAPPI J., 79: 231-234, 1996.

- Hanley, S. J.; Giasson, J.; Revol, J-F.; Gray, D.G. "Atomic force microscopy of cellulose microfibrils: comparison with transmission electron microscopy." Polymer, 33: 4639-4642, 1992.
- Hanley, S.J.; Gray, D.G. "Atomic force microscopy images of black spruce wood sections and pulp fibres." Holzforschung, 48: 29-34, 1994.
- Hatfield, G.R.; Maciel, G.E.; Erbatur, O.; Erbatur, G. "Qualitative and quantitative analysis of solid lignin samples By carbon-13 NMR spectrometry." Anal. Chem., 59: 172-179, 1987.
- Haw, J.F.; Maciel, G.E.; Schroeder, H. A. "Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric study of wood and wood pulping with cross polarization and magic angle spinning." Anal. Chem., 56: 1323-1329, 1984.
- Hemmingson, J.A.; Wong, H. "Characterization of photochemically degraded newsprint solubles by carbon-13 NMR and IR spectroscopy." Holzforschung, 43:141-147, 1989.
- Hemmingson, J.A.; Morgan, K.R. "A CP/MAS carbon-13 NMR study of photodegraded newsprint." Holzforschung, 44: 127-131, 1990.
- Himmelsbach, D.S.; Barton, F.E.; Windham, W.R. "Comparison of carbohydrate, lignin and protein ratios between grass species by cross-polarization magic angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance." J. Agric. Food Chem., 31: 401-404, 1983.
- Hortling, B.; Korhonen, M.; Buchert, J.; Sundquist, J.; Viikari, L. "The leachability of lignin from kraft pulps after xylanase treatment." Holzforschung, 48: 441-446, 1994.
- Inagaki, K.; Nakahira, K.; Mukai, K.; Tamura, T.; Tanaka, H. "Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*." Biosci. Biotechnol. Biochem., 62: 1061-1067, 1998.
- Istone, W.K. "X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)." Surface Analysis of paper (Connors, T.E. and Banerjee, S.), CRC press, 235-268, 1995.
- Jeffries, T.W. "Biochemistry and genetics of microbial xylanases." Curr. Opin. Biotechnol., 7: 337-342, 1996.
- Jeffries, T.; Grabski, A.; Patel, R.N.; Elegir, G.; Szakacs, G. "Method of removing color from wood pulp using xylanase from *Streptomyces roseiscleroticus*." Biotechnol. Adv., 15: 296, 1997.
- Jeffries, T.W.; Davis, M.; Rosin, B.; Landucci, L.L. "Mechanisms for kappa reduction and color removal by xylanases." Proc. 7th Int. Conf. on Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry, vol. 7C, 41-44, 1998.
- Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; kekos, D.; Macris, B.J. "Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes." J. Biotechnol., 60: 155-163, 1998.
- Kantelinen, A.; Hortling, B.; Sundquist, J.; Linko, M.; Viikari, L. "Proposed mechanism of the enzymic bleaching of kraft pulp with xylanases." Holzforschung, 47: 318-324, 1993.

- Karlsson, E.N.; Dahlberg, L.; Torto, N.; Gorton, L.; Holst, O. "Enzymatic specificity and hydrolysis pattern of the catalytic domain of the xylanase Xyn 1 from *Rhodothermus marinus*." J. Biotechnol., 60: 23-35, 1998.
- Kazayawoko, M.; Balatinecz, J.J.; Woodhams, R.T.; Sodhi, R.N.S. "X-ray photoelectron spectroscopy of lignocellulosic materials treated with maleated polypropylenes." J. Wood Chem. Technol., 18:1-26, 1998.
- Khandke, K.M.; Vithayathil, P.J.; Murthy, S.K. "Purification and characterization of an α -D-glucuronidase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*." Arch. Biochem. Biophys., 274: 511-517, 1989.
- Kim, Y. S.; Newman, R.H. "Solid state ^{13}C NMR study of wood degraded by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*." Holzforschung, 49: 109-114, 1995.
- Kimura, T.; Kimura, F.; Argyropoulos, D.S. e Gray, D.G. "CP/MAS NMR study of photodegraded stoneground wood pulp." Holzforschung, 46: 331-336, 1992.
- Kishimoto, T.; Nakatsubo, F. "Non-chlorine bleaching of kraft pulp IV. Oxidation of methyl-4-O-ethyl- β -D-glucopyranoside with Fenton's reagent: effects of pH and oxygen." Holzforschung, 52: 180-184, 1998.
- Krengel, U.; Dijkstra, B.W. "Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanases from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum." J. Mol. Biol., 263:70-78, 1996.
- Kuys, K.; Zhu, T.; Parker, I.; Vanderhoek, N. "Surface chemistry of total chlorine free bleached eucalypt kraft pulps." Proc. The 8th Symp. on Wood and Pulping Chemistry, vol.I, 581-588, 1995.
- Laine, J.; Stenius, P.; Carlsson, G.; Strom, G.. "Surface characterization of unbleached kraft pulps by means of ESCA." Cellulose, 1: 145-160, 1994.
- Laine, J.; Stenius, P.; Carlsson, G.; Strom, G.. "The effect of ECF and TCF bleaching on the surface chemical composition of kraft pulp as determined by ESCA". Nordic Pulp Pap. Res. J., 3: 201-210, 1996a.
- Laine, J.; Buchert, J.; Viikari, L.; Stenius, P. "Characterization of unbleached kraft pulps by enzymic treatment, potentiometric titration and polyelectrolyte adsorption." Holzforschung, 50: 208-214, 1996b.
- Lan Pham, P.; Alric, I. e Delmas, M. "Incorporation of xylanase in total chlorine free bleach sequences using ozone and hydrogen peroxide." APPITA J., 48: 231-217, 1995.
- Leduc, C.; Daneault, C.; Delaunois, P.; Jaspers, C.; Pennick, M. "Enzyme pre-treatment of kraft pulp to reduce consumption of bleach chemicals." APPITA J., 48:435-439, 1995.
- Lennholm, H.; Iversen, T. "Estimation of cellulose I and II in cellulosic samples by principal component analysis of ^{13}C -CP/MAS NMR spectra." Holzforschung, 49: 119-126, 1995a.

- Lennholm, H.; Iversen, T. "Classification of pulp fibres from different wood species by multivariate data analysis of ^{13}C -CP/MAS NMR spectra." Holzforschung, 49: 462-464, 1995b.
- Lennholm, H.; Wallbacks, L.; Iversen, T. "A ^{13}C -CP/MAS-NMR spectrometric study of the Effect of laboratory kraft cooking on cellulose structure." Nordic Pulp Paper Res. J., 10: 46-50, 1995.
- Lindgren, T.; Edlund, U. "Prediction of lignin content and pulp yield from black liquor composition using near infrared spectroscopy and partial least squares regression." Nordic Pulp Paper Res. J., 13: 76-80.
- López, C.; Blanco, A.; Pastor, F.I.J. "Xylanase production by a new alkali-tolerant isolate of *Bacillus*." Biotechnol. Lett., 20: 243-246, 1998.
- Lorenzoni, D.E.D.P. "Lignin studied by atomic force microscopy." Tese de doutorado, Universidade de Basle, Basle, Suíça, abril, 1998.
- Maiti, B.; Whitmire, D. "Xylanase molecular size, pulp pore structure and pulp delignification" Chem. Eng. Commun., 162: 169-178, 1997.
- Mandels, M.; Reese, E.T. "Induction of cellulase in *Trichoderma viride*." J. Bacteriol., 73: 269-278, 1957.
- Mansfield, S.D.; Wong, K.K.Y.; Jong, E.; Saddler, J.N. "Modification of Douglas-fir mechanical and kraft pulps by enzyme treatment." TAPPI J., 79: 125-132, 1996a.
- Mansfield, S.D.; Wong, K.K.Y.; Jong, E.; Saddler, J.N. "Xylanase prebleaching of fractions of Douglas-fir kraft pulp of different fibre length." Appl. Microbiol. Biotechnol., 46: 319-326, 1996b.
- Mansfield, S.D.; De Jong, E.; Stephens, R.S.; Saddler, J.N. "Physical characterization of enzymatically modified kraft pulp fibers." J. Biotechnol., 57: 205-216, 1997.
- Michell, A.J. "Pulpwood quality estimation by near-infrared spectroscopic measurements on eucalypt woods." APPITA J., 48: 425-428, 1995.
- Michell, A.J.; Schimleck, L.R. "Further classification of eucalypt pulpwoods using principal component analysis of near-infrared spectra." APPITA J., 51: 127-131, 1998.
- Miller, G.L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Anal. Chem., 31: 426-428, 1959.
- Milner, Y.; Avigad, G. "A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses." Carbohydr. Res., 4: 359-361, 1967.
- Muilu, J.; Torronen, A.; Perakyla, M.; Rouvinen, J. "Functional conformational changes of endo-1,4-xylanase II from *Trichoderma reesei*: A molecular dynamics study." Protein-Struct. Funct. Genet., 31: 434-444, 1998.

- Nelson, N. "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose." J. Biol. Chem., 153:375-380, 1944.
- Nelson, P.J.; Chin, C.W.J.; Grover, S.G. "Bleaching of kraft pulps from Australian *Eucalyptus* Woods." Pulp Pap. Can., 97: 19-23, 1996.
- Nimz, H. "Beech lignin-proposal of a constitutional scheme." Angew. Chem. Int. ed. Engl., 13:313-321, 1974.
- Newman, R.H. "Nuclear magnetic resonance study of spatial relationships between chemical components in wood cell walls." Holzforschung, 46: 205-210, 1992.
- Newman, R.H.; Hemmingson, J.A. e Suckling, I.D. "Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of kraft pulp." Holzforschung, 47: 234-238, 1993.
- Paice, M.G.; Gurnagul, N.; Page, D.H.; Jurasek, L. "Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps." Enzyme Microb. Technol., 14: 272-276, 1992.
- Pazner, L.; Behera, N.C. "Topochemistry of softwood delignification by alkali earth metal salt catalysed organosolving pulping." Holzforschung, 43: 159-168, 1989.
- Pekarovicova, A.; Kozankova, J.; Mikulasova, M.; Jancovic, P.; Pekarovic, J. "SEM study of xylanase pretreated pulps" Progress Biotechnol., 7: 359-364, 1992.
- Pereira, D.E.D.; Claudio-da-Silva Jr., E. "The atomic force microscopy as a tool for lignin characterization studies." Proc. The 3rd Brazilian Symp. on the Chem. of Lignin and Other Wood Components, vol.IV, 144-149, 1993.
- Pereira, D.E.D.; Claudio-da-Silva Jr., E. "Improvement of atomic force microscopy (AFM) as analytical instrument for residual lignin characterization." Proc. the 8th Symp. on Wood and Pulping Chemistry, vol.1, 467-474, 1995.
- Perry, S.S.; Somorjal, G.A. "Characterization of organic surfaces." Anal. Chem., 66: 403A - 415A, 1994.
- Philipp, P.; D'Almeida, M.L.O. Celulose e Papel. Volume I – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica. Instituto de pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT, 2ª edição, 1988.
- Pope, J.M. "Near-infrared spectroscopy of wood products." Surface Analysis of paper (Connors, T.E. and Banerjee, S.), CRC press, 142 -151, 1995.
- Rahim, M.A.; Sih, C.J. "Microbial Steroid Esterases." Methods Enzymol., 15: 675-690, 1969.
- Rahkamo, L.; Viikari, L.; Buchert, J.; Paakkari, T.; Suortti, T. "Enzymatic and alkaline treatments of hardwood dissolving pulp." Cellulose, 5: 79-88, 1998.
- Ratto, M.; Poutanen, K. "Production of mannan-degrading Eenzymes ." Biotechnol. Lett., 10: 661-664, 1988.

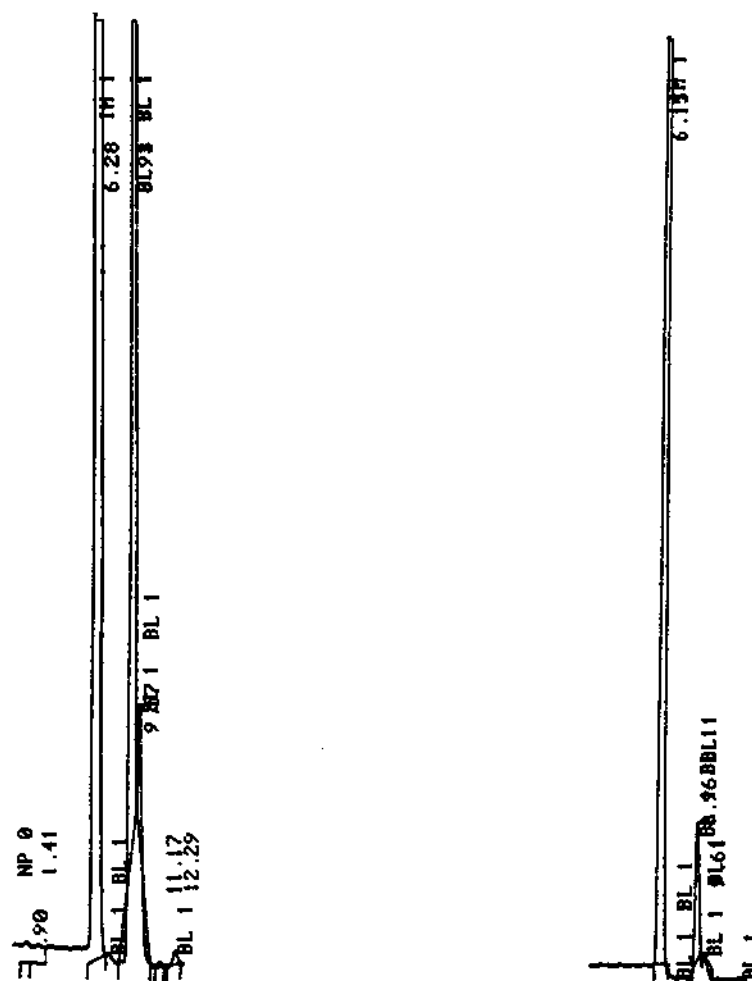
- Roncero, M.B.; Torres, A.L.; Colom, J.F.; Vidal, T.; Queral, M.A. "Xylanase influence of fiber surface and bleaching kinetics." Proc. 7th Int. Conf. on Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry, vol. 7C, 15-18, 1998.
- Ruggiero, R.; Machado, A.E.H.; Perez, D.D.; Grelier, S.; Nourmamode, A.; Castellan, A. "Bleached chemical pulp from *Eucalyptus grandis* wood produced by peroxyformic acid pulping and photochemical bleaching." Holzforschung, 52: 325-332, 1998.
- Saake, B.; Clark, T.; Puls, J. "Investigations on the reaction mechanism of xylanases and mannanases on sprucewood chemical pulps." Holzforschung, 49: 60-68, 1995.
- Scarminio, I. S. Tese de Doutorado, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - S.P., Brasil, 1989.
- Schimleck, L.R.; Michell, A.J.; Vinden, P. "Eucalypt wood classification by NIR spectroscopy and principal componentes analysis." APPITA J., 49: 319-324, 1996.
- Seisto, A.; Poppius-Levlin, K.; Fuhrmann, A. "Correlation between chemical, fibre and paper properties of peracid and chlorine dioxide bleached pine and birch kraft pulps by multivariate analysis." Pap.Puu-Pap. Tim., 80: 520-528, 1998.
- Senior, D.J.; Hamilton, J.; Bernier, R.L.; Du Manoir, J.R. "Reduction in chlorine use during bleaching of kraft pulp following xylanase treatment". TAPPI J., 75:125-130, 1992.
- Senior, D.J.; Hamilton, J. "Xylanase treatment for the softwood kraft pulps: the effect of chlorine dioxide substitution". TAPPI J., 76: 200- 206, 1993.
- Senior, D.J.; Hamilton, J.; Ragauskas, A.J.; Froass, P. "Interaction of hydrogen peroxide and chlorine dioxide stages in ECF bleaching." TAPPI J., 81: 170-178, 1998.
- Shen, W.; Parker, I.H.; Sheng, Y.J. "The effects of surface extractives and lignin on the surface energy of eucalypt kraft pulp fibres." J.Adhes. Sci. Technol., 12: 161-174, 1998a.
- Shen, W.; Yao, W.; Li, M.L.; Parker, I. "Characterization of eucalypt fibre surface using inverse gas chromatography and X-ray photoelectron spectroscopy." APPITA J., 51: 147-151, 1998b.
- Shevchenko, S.M.; Yu, Y.S.; Akim, L.G.; Bailey, G.W. "Comparing surface morphology of lignin-carbohydrate complex and humic substances: AFM/VR approach." Holzforschung, 52: 149-156, 1998.
- Silveira, G.; Forsberg, P.; Conners, T.E. "Scanning electron microscopy: a tool for the analysis of wood pulp fibers and paper." Em: Surface Analysis of Paper, Coner, T.E. e Banerjee S. eds., CRC Press, Mississipi, 41-71, 1995.
- Spurr, A.R. "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy." J.Ultrastruct. Res., 26: 31-43, 1969.

- Stauber, J.; Gunthorpe, L.; Woodworth, J.; Munday, B.; Karassoi, R.; Simon, J. "Comparative toxicity of effluents from ECF and TCF bleaching of eucalypt kraft pulps." APPITA J., 49: 184-188, 1996.
- Stenius, P.; Laine, J. "Studies of cellulose surfaces by titration and ESCA." Appl. Surf. Sci., 75: 213-219, 1994.
- Stoyanova, R.; Kuesel, A.C.; Brown, T.R. "Application of principal components analysis for NMR spectral quantitation." J. Magnetic Resonance, A115: 265-269, 1995.
- Suss, H.U.; Nimmerfroeh, N.F.; Kronis, J.D. "The naked truth on hot peroxide bleaching". Pulp Pap. Can., 99: 63-66, 1998.
- Suurnakki, A.; Kantelinen, A.; Hortling, B.; Buchert, J.; Viikari, L. "Enzymatic solubilization of hemicelluloses in industrial softwood kraft pulps." Holzforschung, 48: 291-296, 1994.
- Suurnakki, A.; Clark, T.; Allison, R.W.; Viikari, L.; Buchert, J. "Xylanase and mannanase -aided elemental (ECF) and totally (TCF) chlorine-free bleaching." TAPPI J., 79: 111-117, 1996a.
- Suurnakki, A.; Heijnesson, A.; Buchert, J.; Westermarck, U.; Viikari, L. "Effect of surfaces on enzyme-aided bleaching of kraft pulps." J. Pulp Pap. Sci., 22: J91-J96, 1996b.
- Suurnakki, A.; Heijnesson, A.; Buchert, J.; Tenkanen, M.; Viikari, L.; Westermarck, U. "Location of xylanase and mannanase action in kraft fibers." J. Pulp Pap. Sci., 22: J78-J83, 1996c.
- Suurnakki, A.; Heijnesson, A.; Buchert, J.; Viikari, L.; Westermarck, U. "Chemical characterization of the surface layers of unbleached pine and birch kraft pulps." J. Pulp Pap. Sci., 22: J43-J47, 1996d.
- Suurnakki, A.; Li, T.Q.; Buchert, J.; Tenkanen, M.; Viikari, L.; Vuorinen, T.; Odberg, L. "Effects of enzyme removal xylan and glucomannan on the pore size distribution of kraft fibers." Holzforschung, 51: 27-33, 1997.
- Tagawa, K.; Kaji, A. " α -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*". Methods Enzymol., 160: 707-708, 1988.
- Tan, L.U.L.; Mayers, P.; Saddler, J.N. "Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*". Can. J. Microbiol., 33: 689-692, 1987.
- Tanaka, T.; Taniguchi, M.; Matsuno, P.; Kamikubo, T. "Purification and properties of cellulase from *Eupenicillium javanicum*." J. Ferment. Technol., 59: 177-183, 1981.
- TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) - Test Methods. TAPPI press, Atlanta, 1988.
- Timell, T.E. "Wood hemicelluloses: Part II." Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 19: 409-483, 1965.

- Tolan, J.S.; Olson, D.; Dines, R.E. "Survey of xylanase enzyme usage in bleaching in Canada." Pulp & Paper Canada, 96: T403-T406, 1995.
- Tolan, J.S.; Guenette, M. "Using enzymes in pulp bleaching: mill applications." Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 57(Biotechnol. Pulp Pap. Ind.): 289-310, 1997.
- Tolan, J.S.; Thibault, L. "Decreasing ECF bleaching costs with enzymes in a mill with oxygen delignification – Increase pulp brightness, as well, without affecting plant operations." Pulp Pap. Can., 98: 147-150, 1997.
- Torr, K.M.; Dawson, S.W.; Ede, R.M.; Singh, J. "Surface changes on acetylation and exposure to ultraviolet radiation of *Pinus radiata* using X-ray photoelectron spectroscopy". Holzforschung, 50: 449-456, 1996.
- Torronen, A.; Rouvinen, J. "Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases." J. Biotechnol., 57:137-149, 1997.
- Valchev, I.; Yotova, L.; Valcheva, E. "Kinetics of xylanase treatment of hardwood pulp." Bioresource Technol., 65: 57-60, 1998.
- Vicuña, R.; Escobar, F.; Osses, M.; Jara, A. "Bleaching of *Eucalyptus* pulp with commercial xylanases." Biotechnol. Lett., 19: 575-578, 1997.
- Vidal, T.; Torres, A.L.; Siles, J. "Xylanase bleaching of *Eucalyptus* kraft pulp: an economical ECF process." APPITA J., 50: 144, 1997.
- Vidal, T.; Muñoz, M.; Colom, J.F. "Xylanase bleaching of *Eucalyptus* kraft pulp – An economical TCF process." Proc. 7th Int. Conf. On Biotechnol. In the Pulp and Paper Industry, vol. 7C, 11- 14, 1998.
- Viikari, L.; Suurnakki, A.; Buchert, J.; Hejnesson, A.; Carlsson, G.; Strom, G.; Westermarck, U. "Mannanases and xylanases in bleaching of softwood kraft pulps." Proc. The 8th Symp. on Wood and Pulp Chemistry, vol. I, 255-262, 1995.
- Vogel, H.J. "A convenient growth medium for *Neurospora crassa*." Microb. Gen. Bull., 13:42-43, 1956.
- Wallbacks, L.; Edlund, U.; Norden, B. "Multivariate characterization of pulp. Part 1." Nordic Pulp Paper Res. J., 6: 74-80, 1991a.
- Wallbacks, L.; Edlund, U.; Norden, B.; Iversen, T.; Mohlin, U-B. "Multivariate characterization of pulp. Part 2." Nordic Pulp Paper Res. J., 6: 104-109, 1991b.
- Wallbacks, L.; Edlund, U.; Lindgren, T.; Agnemo, R. "Multivariate characterization of pulp. Part 3." Nordic Pulp Paper Res. J., 2: 88-93, 1995.
- Watanabe, T.; Mikame, K.; Honda, Y.; Kuwahara, M. "Xylanase-resistant xylan in unbleached kraft pulp." J. Wood Chem. And Technol., 6:109-120, 1996.

- Wong, K.K.Y.; Nelson, S.L.; Saddler, J.N. "Xylanase treatment for the peroxide bleaching of oxygen delignified kraft pulps derived from three softwood species." J. Biotechnol., 48: 137-145, 1996a.
- Wong, K.K.Y.; Yokota, S.; Saddler, J.N.; De Jong, E. "Enzymic hydrolysis of lignin-carbohydrate complexes isolated from kraft pulp." J. Wood Chem. Technol., 16:121-138, 1996b.
- Wong, K.K.Y.; De Jong, E.; Saddler, J.N.; Allison, R.W. "Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp 1. Process parameters." APPITA J., 50:415-422, 1997a.
- Wong, K.K.Y.; Martin, L.A.; Gama, F.M.; Saddler, J.N.; De Jong, E. "Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft pulps." Biotechnol. Bioeng., 54:312-318, 1997b.
- Wong, K.K.Y.; De Jong, E.; Saddler, J.N.; Allison, R.W. "Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part 2: Target substrates" APPITA J., 50: 509-518, 1997c.
- Workman, J. "Interpretive spectroscopy for near infrared." Appl. Spec. Rev., 31: 251-320, 1996.
- Wright, J.A.; Birkett, M.D.; Gambino, M.J.T. "Prediction of pulp and cellulose content from wood samples using near infrared reflectance spectroscopy." TAPPI J., 73: 164-166, 1990.
- Yang, J.L.; Eriksson, K. -E. "Use of hemicellulolytic enzymes as one stage in bleaching of kraft pulps". Holzsforschung, 46:481- 488, 1992.
- Yang, J.L., Sacon, V.M., Low, S.E.; Ericsson, K.-E.L. "Bleaching of *Eucalyptus* kraft pulp with the EnZone process". TAPPI J., 76: 91-96, 1993.
- Yang, J.L.; Cates, D.H.; Law, S.E.; Eriksson, K.E. "Bleaching of softwood kraft pulps with the EnZone Process." TAPPI J., 77: 243-250, 1994.
- Zanuttini, M.; Citroni, M.; Martinez, M.J. "Application of diffuse reflectance infrared fourier transformed spectroscopy to the quantitative determination of acetyl groups in wood." Holzsforschung, 52: 263-267, 1998.

APÊNDICE 1



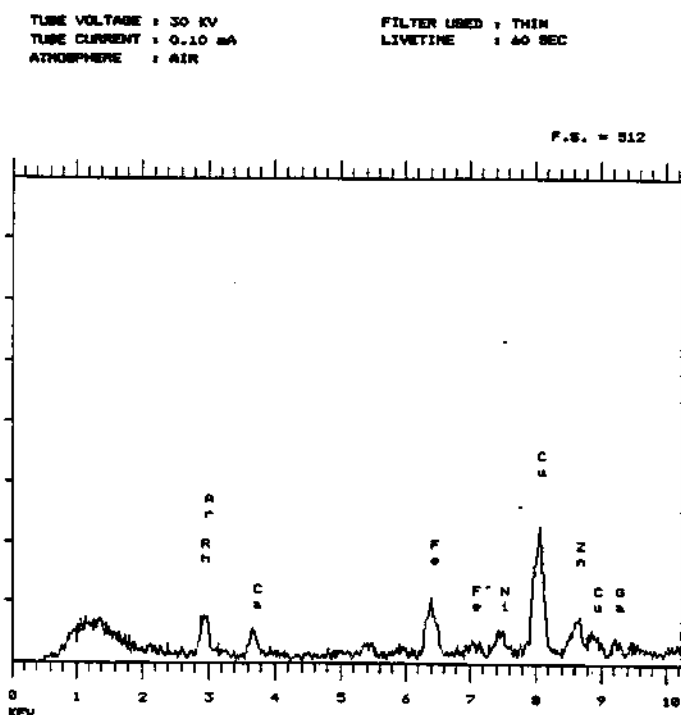
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.017	0.9	4618 02	1	92.191	6.15	2614888 01
2	0.001	1.41	411 13	2	7.291	8.96	206814 62
3	92.771	6.28	25749880 01	3	0.518	9.61	14692 63
4	6.949	8.93	1928756 62				
5	0.164	9.57	45397 63				

Perfil dos cromatogramas de CLAE dos açúcares liberados após hidrólise ácida das polpas de celulose estudadas. tr/glicose = 8,96 ; tr/xilose = 9,6. À direita, cromatograma de amostra diluída, para cálculo do percentual de glicose.

APÊNDICE 2

Análise de metais por Fluorescência de Raio-X de Energia Dispersiva

Elementos de interesse					
Amostras	Ca KA	Fe KA	Cu KA	Ni KA	Zn KA
Intensidade dos picos					
Controle X	7,9333	2,3500	3,9833	0,4667	1,3833
Xilanase 5U/g	4,4000	6,9833	15,9333	2,7500	2,8000
Xilanase 10U/g	4,3833	9,1000	18,7167	3,5167	1,8330
Controle XZ	2,9167	7,7167	18,3500	1,8500	2,7667
Xilanase Z - 5U/g	2,0167	8,5167	17,9667	3,2833	1,8667
Xilanase Z - 10U/g	2,5833	8,0667	15,4833	0,9500	1,2833
Controle XZP	2,9000	7,3167	17,8500	1,8167	1,3333
Xilanase ZP - 5U/g	2,9333	6,9833	18,3667	3,0000	2,8833
Xilanase ZP - 10U/g	3,4167	7,1833	17,5167	3,0667	1,9500



Perfil de um espectro de fluorescência de raio-X de energia dispersiva.

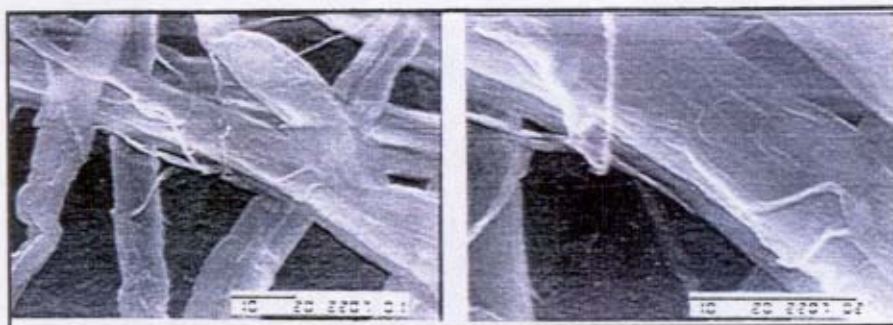
APÊNDICE 3



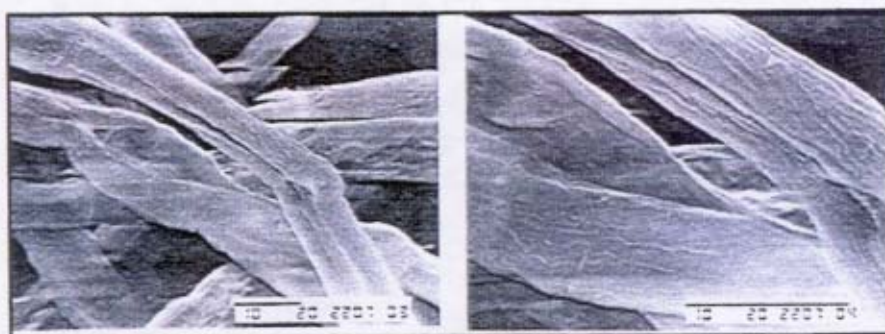
Microscopia eletrônica de transmissão de polpas de celulose de *Eucalyptus grandis*. Amostra de polpa tratada com xilanase no início (acima) e ao final (abaixo) do branqueamento.

APÊNDICE 4

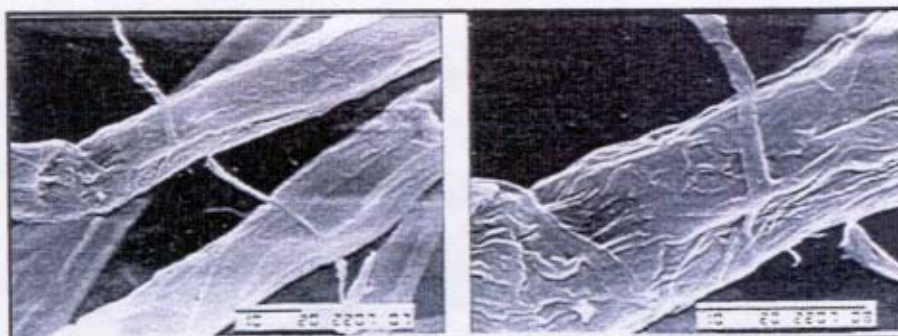
A)



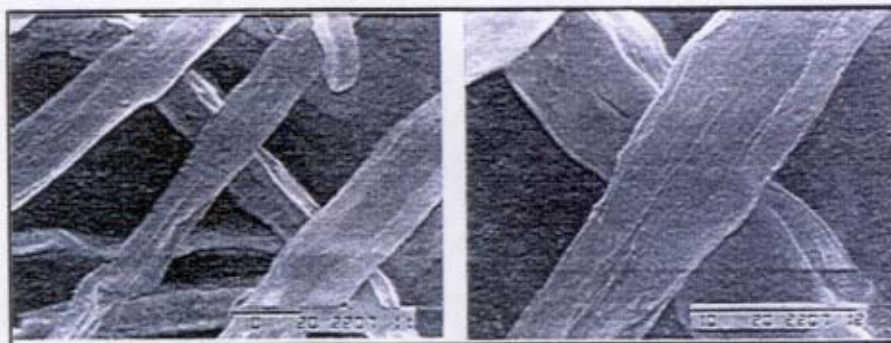
B)



C)

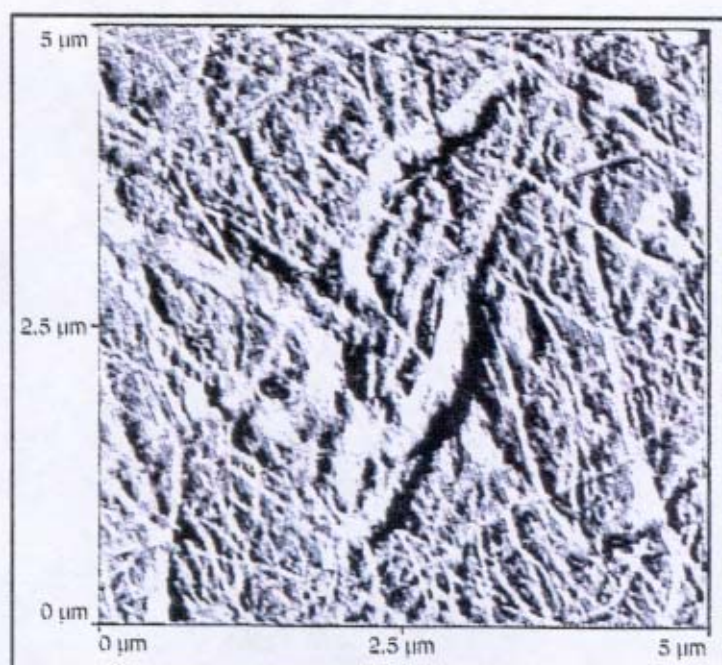
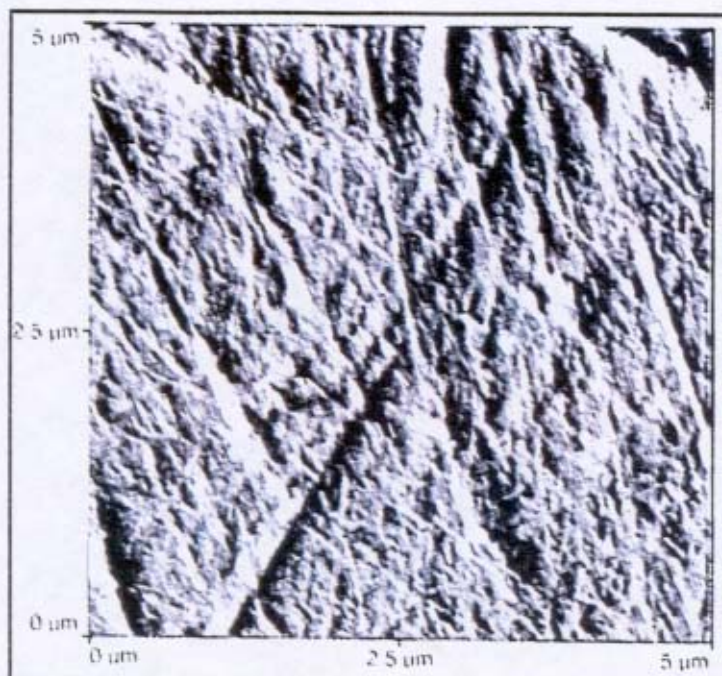


D)



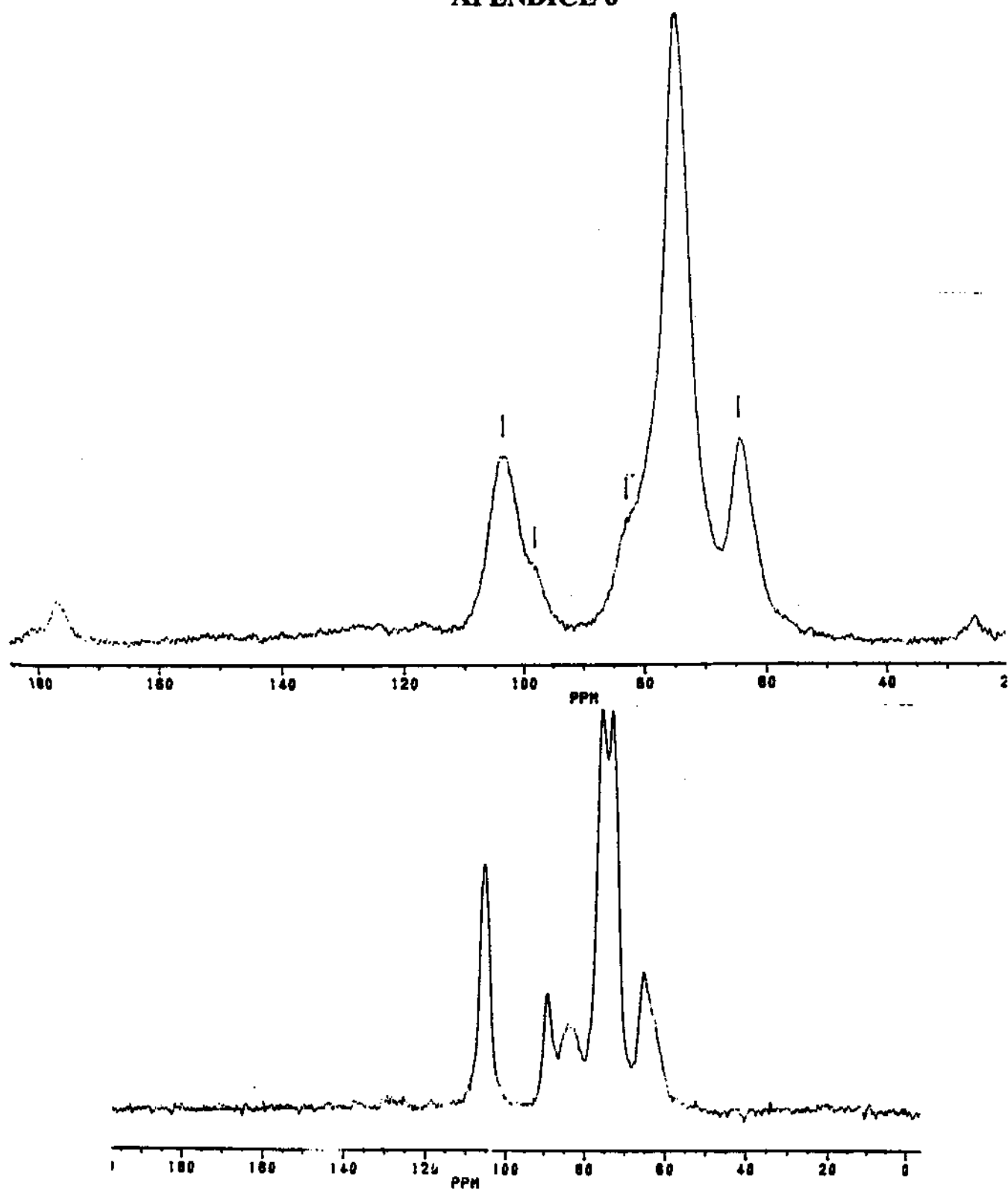
Microscopia eletrônica de varredura de amostras de popas de *Eucalyptus grandis* tratadas com xilanases. A) controle do tratamento com enzima induzida por xilana de bétula. B) tratamento com xilanase induzida por bétula. C) controle do tratamento com enzima induzida por xilana de eucalipto. D) tratamento com xilanase induzida por xilana de eucalipto.

APÊNDICE 5



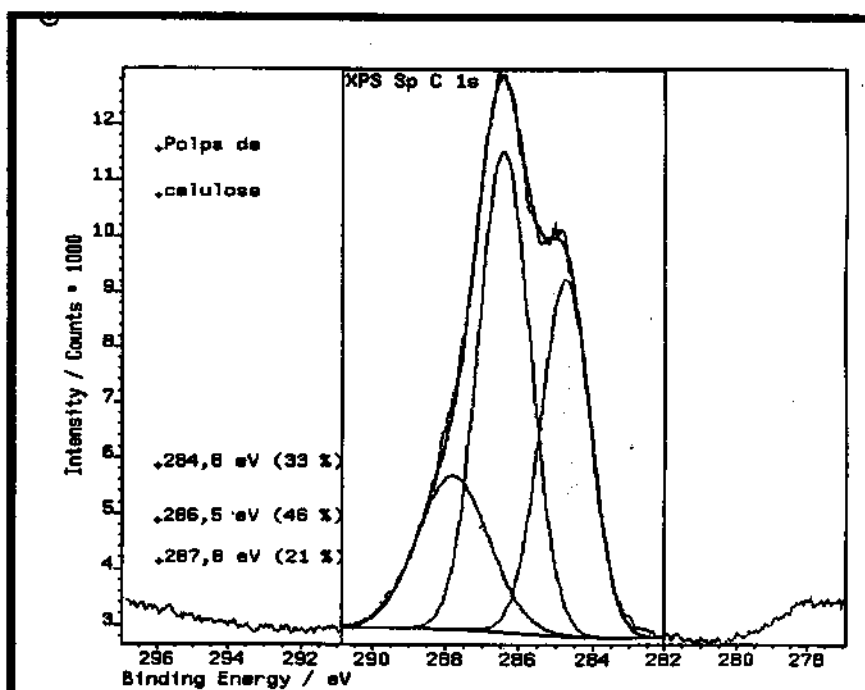
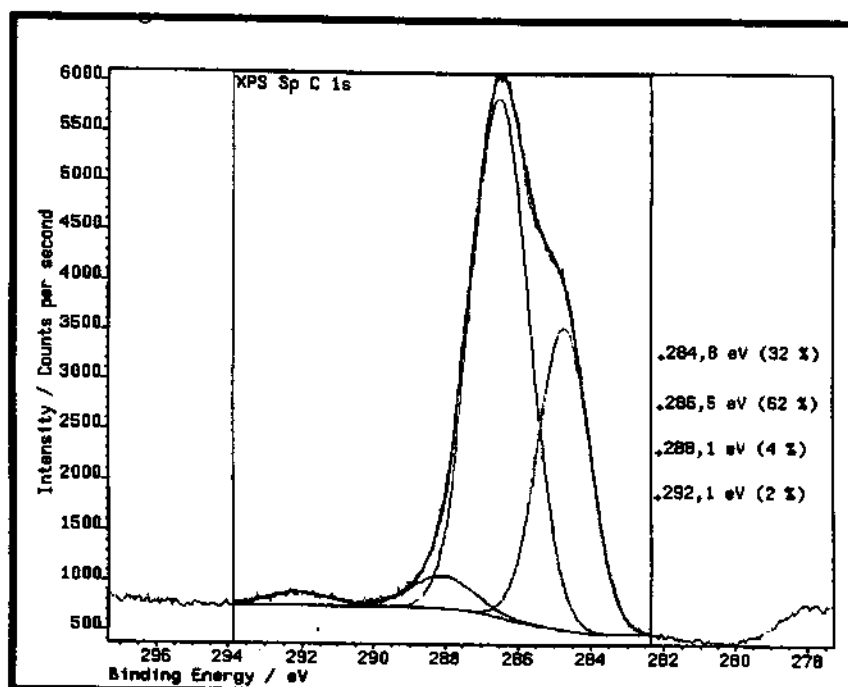
Microscopia de força atômica. Amostra de polpa kraft não branqueada (acima) e após tratamento com xilanase (abaixo).

APÊNDICE 6



Espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 em estado sólido. Amostra de xilana de eucalipto (acima) e amostra de polpa de celulose (abaixo).

APÊNDICE 7



Espectros de fotoelétrons excitados por raio-X. Amostra de lignina de *Eucalyptus grandis* (acima) e amostra de polpa kraft de celulose (abaixo).