

THIAGO ALESSANDRE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLPAS KRAFT
RECICLADAS OBTIDAS POR TRATAMENTO COM
OXIGÊNIO E SISTEMA LACASE-HBT**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica,
Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

**CURITIBA
2005**

Sapientia ars uiuend putanda est.

A filosofia deve ser considerada a arte de viver.

Cicero

Dedico este trabalho a todos aqueles a quem quero bem, como minha família e amigos que sempre foram muito importantes na minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, pela orientação, inestimável dedicação, determinação, compreensão e amizade durante todo o decorrer deste trabalho.

Meu especial agradecimento a minha família, minha mãe, Maria, meu pai, Antônio e meus irmãos, Sheila, Diogo e Felipe, pelo inestimável amor, apoio e compreensão.

A Universidade Federal do Paraná, por ter-me apoiado e ser minha casa durante estes anos.

Aos colegas de laboratório, Anderson, Aline, Cecília, Danyella, Daniel, Emir, Caroline, Leonardo, Leonardo, Ricardo, Vitor, pelo apoio, amizade e companheirismo na execução deste projeto.

Ao Departamento de Bioquímica (UFPR), especialmente ao Marco, pelo auxílio em análises cromatográficas.

Aos amigos que não poderia esquecer de citar, Adaiane Scorcini, Andrezza Beatriz Oliveira, Marcelo Mueller e a Patrícia Doné-Lemay, pelo apoio e estímulo nos momentos de dificuldades.

Ao Dr. Miguel Zanuttini e Paulina Mocchiutti, da Universidad Nacional Del Litoral, pela parceria e colaboração no preparo das amostras.

A todos que contribuíram para este trabalho direta e indiretamente, incluindo todos os colegas, professores e funcionários técnico-administrativos da UFPR (DQUI).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	i
1.1. CELULOSE	2
1.2. HEMICELULOSES	5
1.3. LIGNINA.....	7
1.4. EXTRAÍVEIS	12
1.5. POLPAÇÃO KRAFT	13
1.6. RECICLAGEM	16
1.7. DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	19
2. OBJETIVO	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. MATERIAIS	25
3.2. MÉTODOS.....	25
3.2.1 Obtenção das polpas recicladas	25
3.2.2 Determinação da resistência à tração	26
3.2.3 Isolamento e caracterização dos principais componentes das polpas.....	27
3.2.3.1. <i>Extraíveis</i>	27
3.2.3.2 <i>Lignina</i>	27
3.2.3.3 <i>Holocelulose</i>	28
3.2.3.4 <i>Hemiceluloses e α-celulose</i>	28
3.2.4. Espectroscopia de infravermelho	29
3.2.5. Lignina de Klason	29
3.2.6. Quantificação da lignina pelo brometo de acetila	30
3.2.7. Hidroxilas fenólicas da lignina.....	30
3.2.8. Hidroxilas alifáticas	31
3.2.9. Grupamentos ácidos.....	31
3.2.10. Carbonilas	32
3.2.11. Acetilação das ligninas.....	32
3.2.12. Determinação de açúcares.....	33
3.2.13. CPG das amostras de holocelulose	33
3.2.14. Cinzas	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS POLPAS	38
4.2. COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS	42
4.3. COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRAÍVEIS.....	50
4.4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS LIGNINAS.....	52
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE EVIDENCIANDO A LIGAÇÃO β -(1 \rightarrow 4) (SJÖSTRÖM E WESTERMARK, 1999).....	02
FIGURA 2 -	ANÔMEROS α E β NA CONFORMAÇÃO 4C_1 DA D-GLUCOSE (LEHNINGER, NELSON E COX, 1995).....	03
FIGURA 3 -	LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTER E INTRACADEIAS DE CELULOSE (HINTERSTOISSER E SALMÉN, 2000).....	04
FIGURA 4 -	REGIÕES CRISTALINAS DA CELULOSE, (A) CORRESPONDE A FORMA MONOCLÍNICA (I_β) E (B) TRICLÍNICA (I_α) (FENGEL E WEGENER, 1989).....	05
FIGURA 5 -	MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS POLIOSES (SJÖSTRÖM E WESTERMARK, 1999).....	06
FIGURA 6 -	FRAGMENTO DE UMA ARABINOGLUCURONOXILANA DE CONÍFERAS (FENGEL E WEGENER, 1989).....	07
FIGURA 7 -	BIOSÍNTESE DOS PRECURSORES DA LIGNINA (RALPH <i>et al.</i> ,2001).....	09
FIGURA 8 -	MONÔMEROS FORMADORES DA ESTRUTURA DA LIGNINA (DENCE E LIN, 1992).....	10
FIGURA 9 -	RADICAIS GERADOS PELA AÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DOS CONSTITUINTES DA LIGNINA (FENGEL E WEGENER, 1989).....	11
FIGURA 10 -	CLIVAGEM ALCALINA DE LIGAÇÃO α -ARIL ÉTER EM UNIDADES FENÓLICAS ARIL-PROPANO (CHAKAR E RAGAUSKAS, 2004).....	14
FIGURA 11 -	CLIVAGEM SULFIDOLÍTICA DE LIGAÇÕES β -ARIL ÉTER EM UNIDADES FENÓLICAS ARIL-PROPANOÍDE E CONVERSÃO EM UNIDADES ENOL ÉTER (CHAKAR E RAGAUSKAS, 2004)..	15
FIGURA 12 -	FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA, <i>Trametes hirsuta</i>	20
FIGURA 13 -	POSSÍVEIS FORMAS DE ATUAÇÃO DAS ENZIMAS LACASES E MnP SOBRE SUBSTRATOS FENÓLICOS.....	22
FIGURA 14 -	ESTRUTURA DE UMA LACASE, COM ÁTOMOS DE COBRE REPRESENTADOS EM VERMELHO.....	22

FIGURA 15 -	ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA LACASE SISTEMA MEDIADOR..	23
FIGURA 16 -	REAÇÃO DE CARBAMILAÇÃO DA CELULOSE EMPREGANDO ISOCIANATO DE FENILA.....	35
FIGURA 17 -	GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS HOLOCELULOSES OBTIDAS DE POLPAS KRAFT, PRO E PROL.....	45
FIGURA 18 -	CROMATOGRAMAS DOS HIDROLISADOS DE KLASON COM DETECTOR POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	47
FIGURA 19 -	CROMATOGRAMAS DOS HIDROLISADOS DE KLASON COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA EM 252 nm.....	48
FIGURA 20 -	CROMATOGRAMAS DOS HIDROLISADOS DE KLASON COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA EM 280 nm.....	49
FIGURA 21 -	ESPECTROS POR IVTF DOS EXTRAÍVEIS EM DICLOROMETANO (DCM) DAS POLPAS KRAFT, PRO E PROL.	51
FIGURA 22 -	ESPECTROS POR IVTF DOS EXTRAÍVEIS EM ETANOL:TOLUENO DA POLPA KRAFT, PRO E PROL.....	51
FIGURA 23 -	ESPECTROS POR IVTF DOS EXTRAÍVEIS EM ETANOL 95° DAS POLPAS KRAFT, PRO E PROL.....	52
FIGURA 24 -	ESPECTROS DE FTIR DAS LIGNINAS DIOXANO:HCl KRAFT, PR, PRO E PROL.....	54
FIGURA 25 -	ESPECTROS NO IVTF DAS LIGNINAS ACETILADAS, KRAFT, PRO E PROL.....	56
FIGURA 26 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DE CPG DAS LIGNINAS ACETILADAS....	59
FIGURA 27 -	OXIDAÇÃO DAS FUNÇÕES PRESENTES NA LIGNINA COM A SUBSEQÜENTE CLIVAGEM DE LIGAÇÕES β -ARIL-ÉTER (FENGEL E WEGENER, 1989).....	59
FIGURA 28 -	ÁREAS DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES A PARTIR DO PERFIL DE ELUIÇÃO DE CPG DAS LIGNINAS ACETILADAS	61
FIGURA 29 -	VIAS DE DEGRADAÇÃO DE GUAIACILGLICEROL- β - CONIFERIL ÉTER POR <i>Fusarium solani</i> (A) E <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> (B) (HIGUCHI, 1985).....	62
FIGURA 30 -	MECANISMO DE ATUAÇÃO DO SISTEMA LACASES- MEDIADOR (HBT) SOBRE A LIGNINA, ONDE >N-OH	

	CORRESPONDE A UMA PORÇÃO DA ESTRUTURA DO MEDIADOR (BARRECA <i>et al</i> , 2003).....	63
FIGURA 31 -	OXIDAÇÃO DE COMPOSTO MODELO PELA LACASE SISTEMA MEDIADOR (ELEGIR <i>et al</i> , 2005).....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS POLPAS KRAFT, KRAFT RECICLADA (PR) E KRAFT RECICLADA TRATADA COM OXIGÊNIO NA AUSÊNCIA (PRO) E PRESENÇA DE LACASES-SISTEMA MEDIADOR (PROL).....	39
TABELA 2 -	QUANTIFICAÇÃO DA LIGNINA PRESENTE NAS POLPAS PELOS MÉTODOS DE KLASON E DO BROMETO DE ACETILA.....	39
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS EXTRAÍVEIS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRAÇÕES SEQUÊNCIAIS	42
TABELA 4 -	ANÁLISE GRAVIMÉTRICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DAS POLPAS EM ESTUDO EM RELAÇÃO À MASSA SECA.....	43
TABELA 5 -	GRAU DE POLIMERIZAÇÃO MÉDIO E POLIDISPERSIDADE DA HOLOCELULOSE ISOLADA.....	44
TABELA 6 -	COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS CARBOIDRATOS CONSTITUINTES DAS POLPAS.....	47
TABELA 7 -	PORCENTAGEM (m/m) DOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS DAS LIGNINAS ISOLADAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AQ = água quente

BNDES = Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

BRACELPA = Associação Brasileira de Celulose e Papel

C = concentração

CPG = cromatografia de permeação em gel

DCM = diclorometano

DRIFT = espectrometria no infravermelho de reflectância difusa com transformada de Fourier

ϵ = absortividade molar

ESCA-XPS = espectroscopia fotoeletrônica de raio-X

ET = etanol-tolueno 1:2 (v/v)

EtOH = etanol

FTIR = espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier

GP_M = média ponderada do grau de polimerização

GP_N = média aritmética do grau de polimerização

HBT = hidroxibenzotriazol

HexA = ácido hexenurônico

IR = resistência à tração

kDa = quilo-Dalton

LiP = lignina peroxidase

MnP = manganês peroxidase

PR = polpa reciclada

PRO = polpa reciclada tratada com oxigênio

PROL = polpa reciclada tratada com oxigênio e sistema lacase-mediador

TAPPI = Associação Técnica das Indústrias de Papel e Celulose

TEA = trietanolamina

THF = tetra-hidrofurano

VTT = Centro de Pesquisas Técnicas da Finlândia

RESUMO

O consumo de papel vem aumentando com o decorrer dos anos, fazendo com que sua produção e importância econômica também aumentem, e o principal foco nesta cadeia está voltado aos papéis marrons destinados ao setor de embalagens. Este grande aumento no volume de consumo gera também uma grande quantidade de material que, após o uso, e por razões econômicas e ambientais, deve ser reutilizado. O processo de reciclagem de papel kraft é, basicamente, composto pelas etapas de dissociação e re-agrupamento das fibras, onde etapas de secagem exercem efeitos marcantes nas propriedades físico-mecânicas das fibras. Tratamentos oxidativos, quando empregados em processos de branqueamento de fibras recicladas, alteram positivamente as propriedades das polpas por causarem uma melhora na capacidade de associação interfibrilar. Recentemente, o emprego de lacases tem sido proposto porque estas enzimas causam a oxidação de estruturas fenólicas e, quando auxiliadas por um mediador químico como o hidroxibenzotriazol (HBT), promovem a oxidação de estruturas não fenólicas, aumentando a quantidade de grupos polares na superfície da polpa. Neste estudo, foram produzidos corpos de prova para simulação do processo de produção de papéis kraft para embalagens a partir de uma polpa kraft *liner* de *Pinus* sp.. Posteriormente, as folhas de teste foram desintegradas gerando uma polpa reciclada (PR) que serviu para os testes com sistemas oxidativos empregando oxigênio (PRO) e oxigênio/sistema lacase-mediador (PROL). A análise preliminar da composição química das polpas revelou que o tratamento enzimático oxidativo não acarretou alterações muito significativas no teor de holocelulose, lignina de Klason e cinzas, com exceção dos valores obtidos para o teor de extraíveis. As médias ponderadas do grau de polimerização das holoceluloses isoladas das diferentes polpas se apresentaram muito semelhantes, embora a polidispersidade da holocelulose isolada da polpa PRO tenha sido inferior aos obtidos para as demais holoceluloses. A composição das polpas em carboidratos, determinada por cromatografia de troca iônica nos hidrolisados de Klason, revelaram um pequeno decréscimo na quantidade de glucanas e um ligeiro aumento na quantidade de xilanas e resíduos de arabinosil para as polpas recicladas, sugerindo que o tratamento oxidativo, quer com oxigênio molecular ou lacase-sistema mediador, alterou a relação original entre os carboidratos da polpa. Foi constatado que os extraíveis sofreram grande alteração qualitativa e quantitativa com o tratamento enzimático oxidativo, e que a fração etanol:tolueno acumulou derivados aromáticos funcionalizados. O espectro infravermelho da lignina isolada da polpa PROL, quer na forma bruta ou na forma acetilada, apresentou diferenças marcantes em comparação com as outras ligninas. Observou-se que a reciclagem convencional da polpa kraft acarreta um aumento aparente na massa molar da lignina, sem motivar qualquer oligomerização. Este resultado pode estar associado ao efeito da hornificação das fibras sobre o comportamento macromolecular da lignina, que sofreu um deslocamento da banda de eluição para volumes de retenção inferiores. O tratamento enzimático da polpa kraft reciclada reduziu este efeito, gerando, inclusive, a formação de fragmentos de menor massa molar, cujo perfil de eluição sugere a formação de agregados. A análise dos grupos funcionais da lignina revela claramente os efeitos causados pelo tratamento oxidativo. O aumento nos teores de hidroxilas alifáticas, grupamentos ácidos e carbonílicos foi atribuído à clivagem oxidativa de estruturas encontradas na lignina. Estas cargas aumentaram a capacidade de ligação entre as fibras e, desta forma, justificaram a melhora observada no teste de resistência à tração para a polpa PROL. O tratamento enzimático também reverteu parte dos efeitos da hornificação, tornando o processo oxidativo mais específico, preservando os carboidratos da polpa e, assim, restringindo a sua ação aos extrativos e à lignina residual, que apresentou características diferentes da lignina isolada da polpa original.

ABSTRACT

The production and usage of paper have increased considerably since the last years. Therefore, it can be expected that environmental concerns regarding paper consumption will continue. Among the different kinds of papers, those used for packaging have had the greatest growth rate. These paper grades, which include liner, corrugating medium and boards, are extensively produced from recovered fibers. This growth leading too great volumes of material, and after use has to be recovered for environmental and economically reasons. Steps of dissociation and re-grouping of the fibers, where the drying step is so important for the physical-chemical properties of the pulp, compose the recycling process. Oxidatives treatments, when employed for the bleaching of recycled pulps, change their properties positively because there is a growth in the inter-fiber association. Recently, laccases have been proposed because that enzymes promoting a oxidation of the phenolic structures, and when associated with a chemical mediator, like hydroxybenzotryazole, a oxidation of non-phenolic structures occur and a increase in the polar groups is observed in the surface of the fiber. In this study, handsheets of a kraft liner paper (*Pinus* sp) are made for the simulation of the recycling process. Later, the handsheets has disintegrated generating a recycled pulp, which was treated with the oxidatives process with oxygen (PRO) and with laccases mediator system (PROL). The preliminary analysis of the chemical composition of the pulps reveals that the enzymatic treatment doesn't affect the holocellulose content, Klason lignin and ash, but the extractives are so affected. The DP_w values of the isolated holocelluloses were very similar, even so the polydispersity of the PRO pulp was minor compared with the another pulps. The carbohydrate composition of the pulps, determined in the Klason hydrolysates, show that the oxidative treatments caused no significant change in the amount of pulp glucans (mostly cellulose), but the hemicellulose content appeared to decrease as a result of oxidation. The extractives fractions were affected quantitatively and qualitatively with the enzymatic treatment, and the ethanol:toluene fraction accumulate functional aromatics compounds. The FTIR spectra of the isolated lignin, and of the acetylated lignin, were so different. The conventional recycling process lead to a increase in the apparent molar mass of the lignin. It seems that lignin condensation reactions and/or an increase in associative intermolecular forces produced this slight displacement of the elution band. By contrast, the enzymatic treatment reduced this effect on the lignin structure, generating lower MM lignin fragments that were detected at higher elution volumes. The functional groups analysis reveals clearly the effects of the enzymatic treatment. The increase in the aliphatic, carboxylic and carbonil groups was attributed to the oxidative cleavage of the lignin structure. These charges increase the capacity of binding of the fibers justifying the better result for the tensile index test to the PROL pulp. The enzymatic treatment caused a partial reversion of the detrimental effects of fiber hornification, becoming the process more specific by the carbohydrate preservation, restrict the action of the laccase mediator system in the extractives and lignin, that shown different characteristics from the material in the original pulp.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a indústria do papel e celulose tem um destaque considerável na economia mundial, pois a produção e o consumo de papel vêm crescendo consideravelmente ao longo dos anos. E de todas as categorias de papel, aqueles empregados para o setor de embalagens são os que apresentam as maiores taxas de crescimento, pois o desenvolvimento econômico depende fortemente de seu consumo (BNDES, 1995).

A matéria-prima empregada na fabricação do papel é a polpa celulósica obtida da madeira através de processos de polpação. Portanto, as propriedades físico-mecânicas e o comportamento em reações químicas de uma polpa estão diretamente relacionadas às condições de polpação em que foram obtidas, pois tais condições definem a sua composição química e o grau de associação de seus constituintes. Por outro lado, a qualidade de produtos como o papel também depende dos aditivos empregados nos processos de sua obtenção (GRÖNQVIST *et al.*, 2003; WICKHOLM, LARSSON E IVERSEN, 1998).

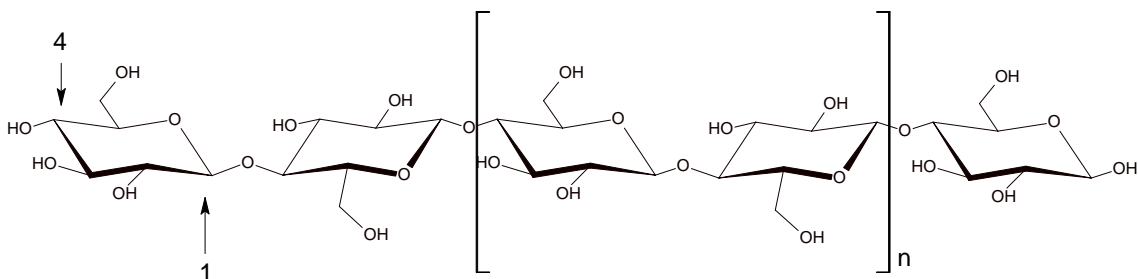
No Brasil, a reciclagem de papel atinge 3 milhões de toneladas por ano, o que corresponde a aproximadamente 44,7% do consumo nacional. Em 2003, o consumo brasileiro de aparas e papéis usados demonstrou que a maior parte dos papéis reciclados são da categoria ondulado (61,21%), seguido pelo papel branco (17,97%) e kraft (8,21%), sendo que as outras categorias (12,61%) fecham o percentual (BRACELPA, 2005). Contudo, os papéis reciclados, obtidos pelos métodos convencionais de reciclagem, não satisfazem a todas as qualidades desejadas para o produto. Assim, o

desenvolvimento de processos alternativos que melhorem as características das polpas recicladas são de fundamental importância para o desenvolvimento do setor.

1.1. CELULOSE

A celulose é constituída por unidades de anidroglicopiranosose (β -D-glucose) ligadas entre si para formar uma cadeia linear com estrutura uniforme (Figura 1). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica do tipo β -(1 \rightarrow 4) através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Esta estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose (FENGEL E WEGENER, 1989).

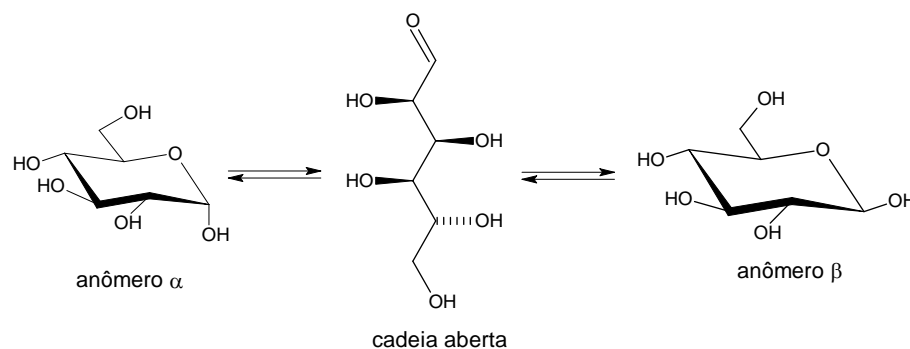
FIGURA 1: ESTRUTURA DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE EVIDENCIANDO A LIGAÇÃO β -(1 \rightarrow 4) (SJÖSTRÖM E WESTERMARK, 1999)



As hidroxilas presentes nas extremidades da cadeia apresentam propriedades diferentes, pois, em um dos extremos, encontram-se envolvidas em uma ligação hemiacetálica de caráter redutor. A ligação hemiacetálica deriva da reação do aldeído em C1, presente na molécula em sua forma livre ou aberta, com a hidroxila do C5, formando um hemiacetal intramolecular. O anel resultante, de seis membros, recebe a denominação de anel piranosídico devido à sua semelhança com a estrutura do pirano. O C1 do anel, denominado de carbono anomérico, é assimétrico, o que permite que a hidroxila

anomérica assume duas possíveis orientações, axial ou equatorial, donde resultam os anômeros α e β , respectivamente (Figura 2). Em solução aquosa, as formas α e β se interconvertem por abertura e fechamento do anel (mutarrotação), até o momento em que se estabelece um equilíbrio (LEHNINGER, NELSON E COX, 1995).

FIGURA 2: ANÔMEROS α E β NA CONFORMAÇÃO 4C_1 DA D-GLUCOSE (LEHNINGER, NELSON E COX, 1995)

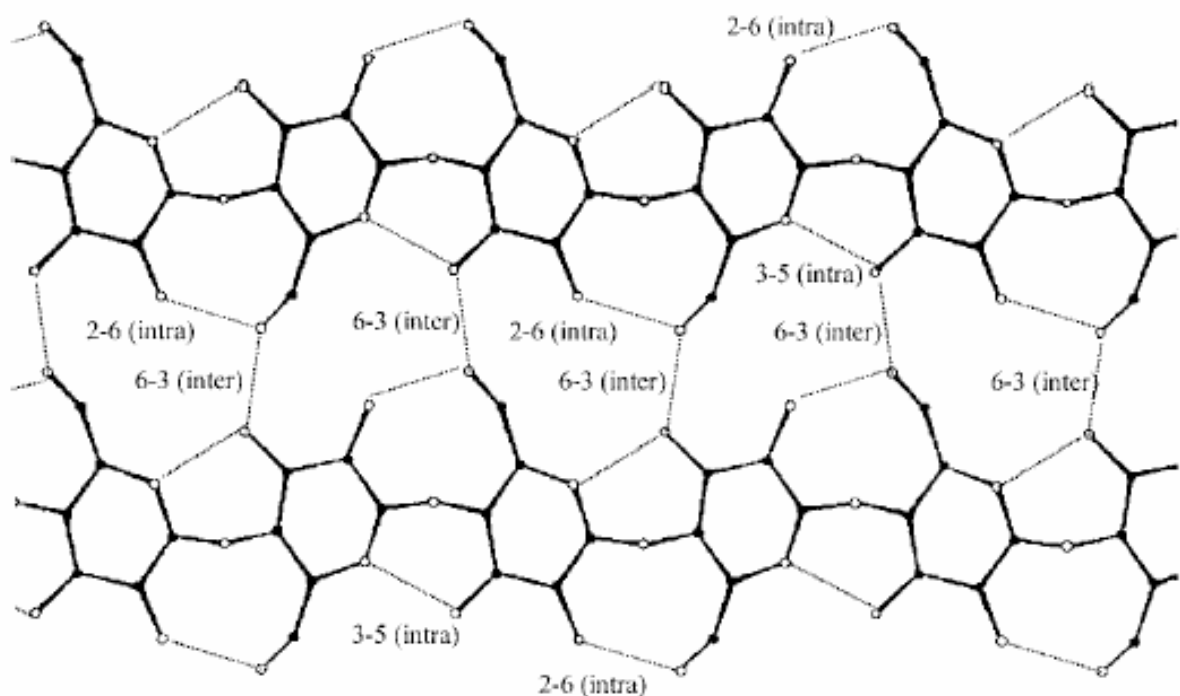


A cadeia macromolecular da celulose assume uma disposição linear devido a três fatores: a hidroxila no carbono anomérico tem orientação equatorial; a conformação em cadeira do anel piranosídico assume a disposição 4C_1 (Figura 2); e a disposição das ligações de hidrogênio intermoleculares e que são formadas entre as hidroxilas de C2 e C6 e entre a hidroxila de C3 e o oxigênio hemiacetalico de unidades adjacentes de glucose que estabilizam a estrutura (Figura 3) (FENGEL E WEGENER, 1989).

Por outro lado, cadeias lineares também interagem entre si através de ligações de hidrogênio intraplanares e interplanares, formando um agregado molecular de alta estabilidade, denominado de fibrila elementar. Estas regiões apresentam alto grau de organização, e por isto, são denominadas de regiões cristalinas (D' ALMEIDA, 1988).

Do arranjo ordenado destas estruturas, com a interveniência de hemicelulose e protolignina, forma-se então o microcristalito, que é o elemento que confere resistência mecânica à microfibrila e, por fim, à fibra celulósica propriamente dita (FENGEL E WEGENER, 1989).

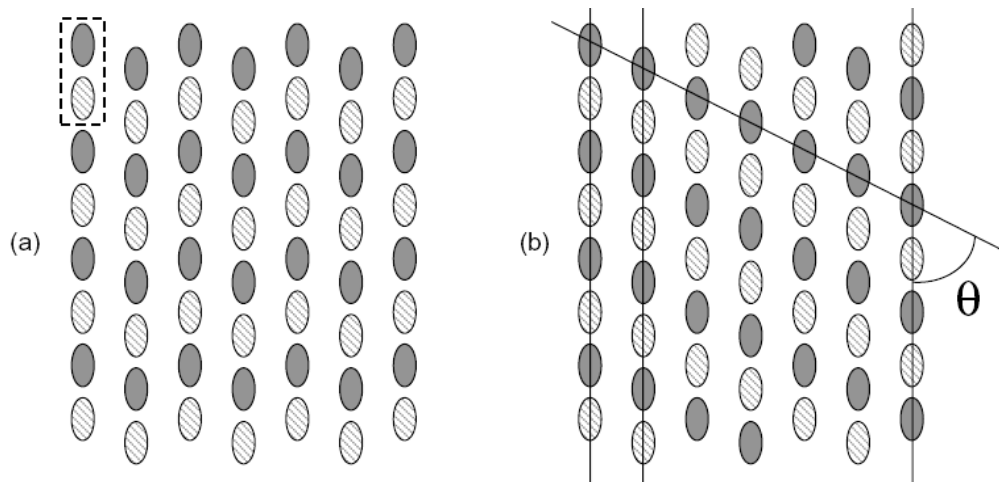
FIGURA 3: LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTER E INTRACADEIAS DE CELULOSE (HINTERSTOISSER E SALMÉN, 2000)



A região cristalina da celulose nativa apresenta duas formas alomórficas, celulose I_{α} e I_{β} (Figura 4), sendo esta última monoclinica e termodinamicamente mais estável. Cada espécie vegetal apresenta sua própria relação entre cada grupo, e durante os processos de obtenção das polpas, a região I_{α} pode sofrer alterações na sua estrutura triclinica que é termodinamicamente menos estável. As interações de hidrogênio que ocorrem em cada forma alomórfica são diferentes resultando a macroestrutura com

propriedades mecânicas distintas (ÅKERHOLM, HINTERSTOISSER E SALMÉN, 2004).

FIGURA 4: REGIÕES CRISTALINAS DA CELULOSE, (A) CORRESPONDE A FORMA MONOCLÍNICA (I_{β}) E (B) TRICLÍNICA (I_{α}) (FENGEL E WEGENER, 1989)

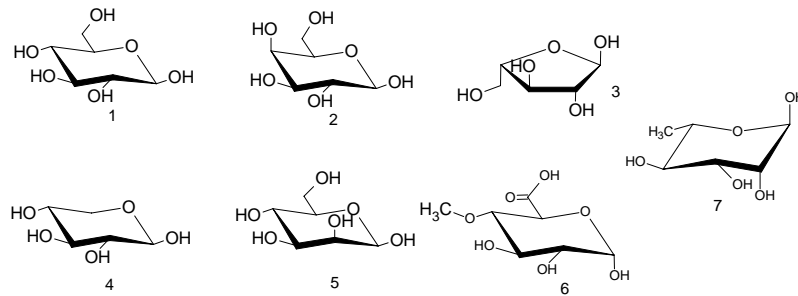


1.2. HEMICELULOSES

Na parede celular de tecidos vegetais, a celulose e a lignina estão interpenetradas por uma mistura de polissacarídeos. Estes são denominados de hemiceluloses e pertencem a um grupo de polissacarídeos heterogêneos formados por uma rota biossintética diferente da celulose (SJÖSTRÖM, 1992; FENGEL E WEGENER, 1989). Por hidrólise ácida, as hemiceluloses liberam os seus constituintes monoméricos, que incluem várias unidades monossacarídicas como a D-glucose (1), D-manose (5), D-galactose (2), D-xilose (4), L-arabinose (3) e pequenas quantidades de L-ramnose (7) e de ácido α -4-O-metil-D-glucurônico (6) (Figura 5) (SJÖSTRÖM, 1992). Comparada à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois

oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores (SCHUERCH, 1963).

FIGURA 5: MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS POLIOSES (SJÖSTRÖM E WESTERMARK, 1999)



As cadeias de poliooses (hemiceluloses) podem se apresentar constituídas somente por uma unidade monossacarídica, como as xilanas, ou por duas ou mais unidades, como no caso das 4-*O*-metil-glucuronoxilanas, xiloglucanas ou arabinoxilanas (FENGEL E WEGENER, 1989). Coníferas e folhosas diferem não somente no conteúdo de poliooses, mas também pelo tipo de poliooses que apresentam em sua constituição (SJÖSTRÖM, 1992). As glucomananas de coníferas são polímeros lineares formados por unidades de D-manopiranosose e D-glucopiranosose ligados por ligações β -(1 \rightarrow 4), enquanto que as galactoglucomananas contêm substituintes acetílicos nos carbonos C-2 e C-3, com grau de acetilação entre 0,17 e 0,36. Encontram-se também nas coníferas arabinoglucuronoxilanas cujo esqueleto é formado por unidades de D-xilopiranosose ligada por enlaces glicosídicos do tipo β -(1 \rightarrow 4), com ramificações de unidades do ácido 4-*O*-metil-D-glucurônico e α -L-arabinofuranose nas posições C6 e C2, respectivamente (Figura 6). As glucomananas de folhosas não apresentam substituições e têm maior relação glucose/manose que as galactoglucomananas de coníferas. Por outro lado, suas 4-

coniferílico, sinapílico e p-cumárico (DENCE E LIN, 1992). Sua biossíntese se inicia com a glucose, oriunda da fotossíntese, que é convertida ao ácido shiquímico (“shikimic acid”), intermediário mais importante na via que leva o seu nome. Os dois aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, são formados pela redução e aminação do ácido pré-fênico, que é oriundo do ácido shiquímico (Figura 7). Estes aminoácidos atuam como precursores do metabolismo enzimático fenilpropanóide (via do ácido cinâmico), que levarão não somente aos álcoois cinâmicos, mas também aos componentes extraíveis como os flavonóides e estilbenos. Os aminoácidos são inicialmente desaminados aos correspondentes ácidos cinâmicos pelas enzimas fenilalanina amônia liase e tirosina amônia liase. Posteriormente, sofrem reações de hidroxilação e metilação, realizadas respectivamente pelas fenolases e *O*-metil-transferases, que levam aos ácidos p-cumárico, cafêico, ferúlico, 5-hidroxi-ferúlico e sinápico. Estes ácidos são convertidos em seus respectivos álcoois por enzimas redutoras, obtendo-se os monômeros da macromolécula da lignina (Figura 8) (FENGEL E WEGENER, 1989).

Os monômeros formadores da lignina, álcool coniferílico, sinapílico e p-cumárico, são sintetizados no citoplasma (retículo endoplasmático ou complexo de Golgi) e liberados em vesículas como monolignóis ou monolignóis glicosilados. As enzimas envolvidas no processo de polimerização destas unidades compreendem enzimas peroxidases e oxidases, incluindo lacases. As oxidases podem ser associadas aos estágios iniciais de lignificação, enquanto que as peroxidases referem-se aos estágios finais, com efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio, dando origem à morte celular programada (apoptose) (DONALDSON, 2001).

FIGURA 7: BIOSÍNTESE DOS PRECURSORES DA LIGNINA (RALPH *et al*,2001)

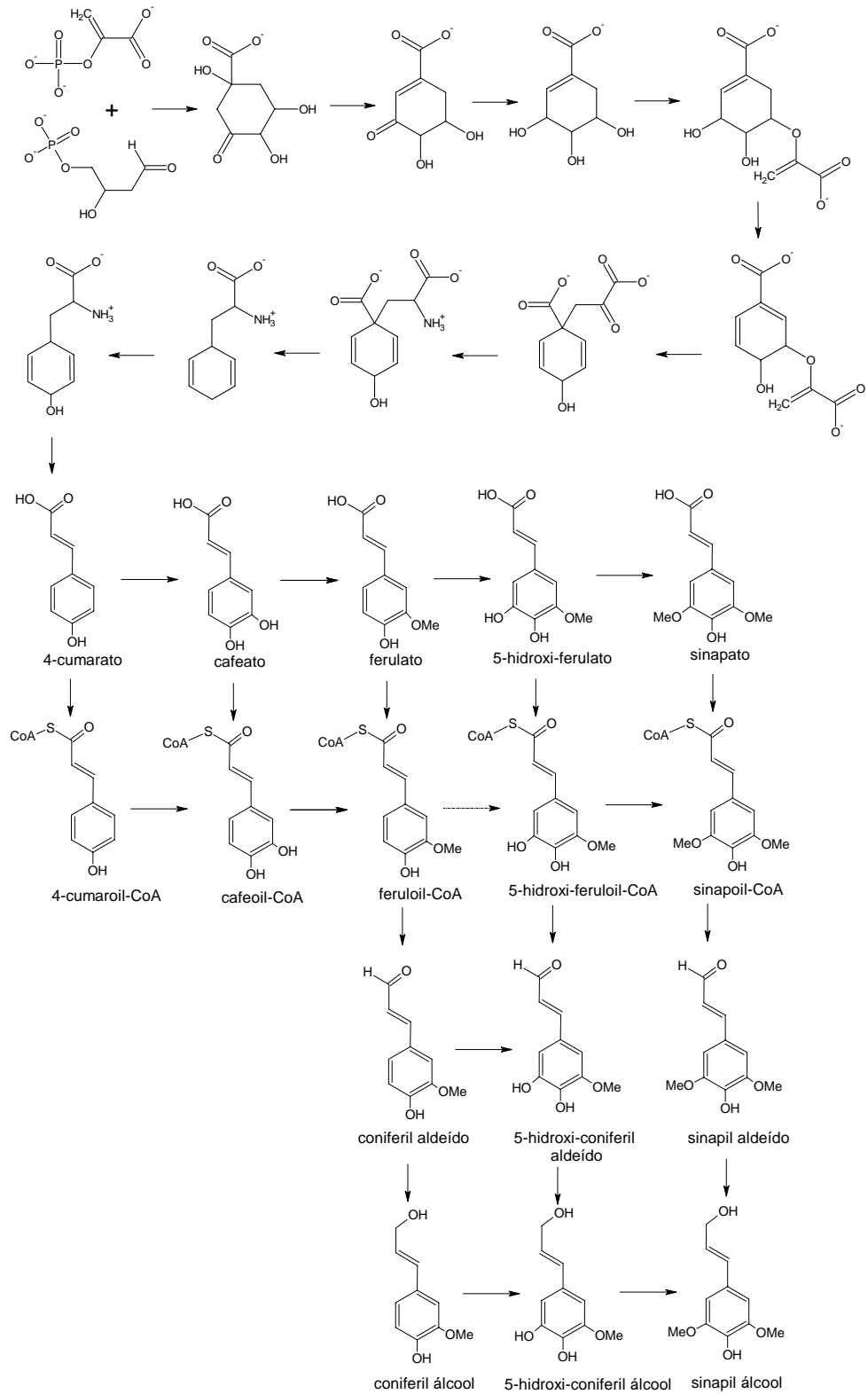
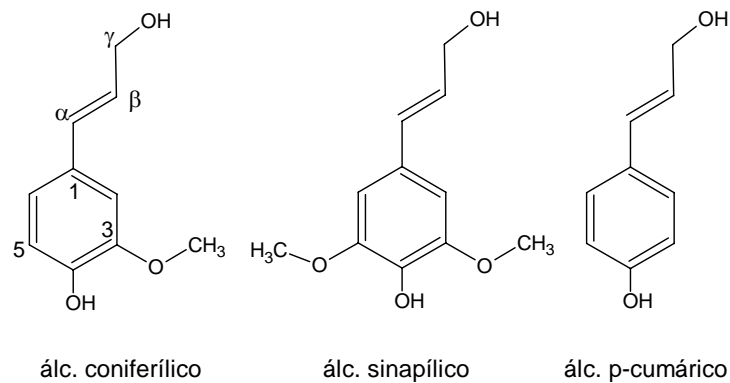


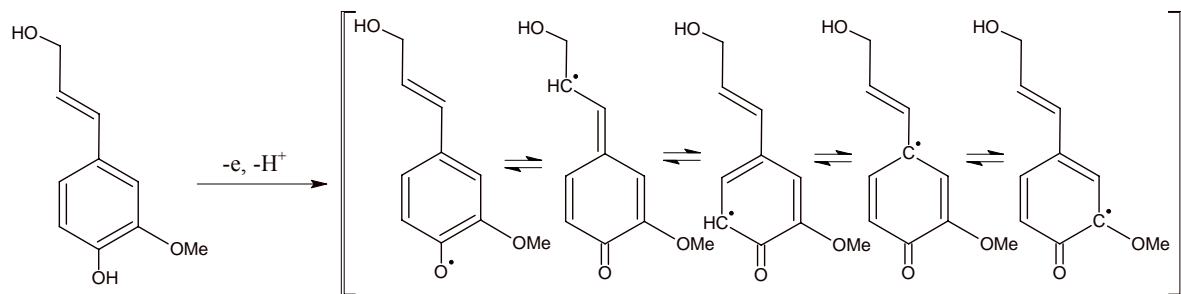
FIGURA 8: MONÔMEROS FORMADORES DA ESTRUTURA DA LIGNINA (DENCE E LIN, 1992)



Os monômeros apresentados na Figura 8 sofrem reações de oxidação gerando radicais (Figura 9), seguindo de acoplamento, adição de água ou de grupos hidroxila a intermediários quinonametídeos, que levam a unidades regulares distribuídas randomicamente na estrutura da macromolécula. Por esta razão, a lignina não é vista como um composto definido, mas como uma composição de materiais física e quimicamente heterogêneos que podem ser representados por modelos. Estes modelos não representam a estrutura real, mas indicam os tipos de ligações que podemos observar na macroestrutura (DENCE E LIN, 1992; FENGEL E WEGENER, 1989).

O processo de lignificação é influenciado pela matriz de carboidratos sobre a qual se desenvolve. O crescimento de partículas de lignina na lamela média e na parede primária forma estruturas esféricas amorfas, enquanto que, na parede secundária, a lignina forma estruturas alongadas seguindo a orientação das microfibrilas. Deste modo, os carboidratos exercem influência mecânica no processo de lignificação, onde os anéis aromáticos são orientados com o plano de crescimento da parede celular (DONALDSON, 2001).

FIGURA 9: RADICAIS GERADOS PELA AÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DOS CONSTITUINTES DA LIGNINA (FENGEL E WEGENER, 1989)



Há evidências de que existam ligações covalentes entre a lignina e as hemiceluloses, particularmente através de unidades de arabinose, xilose e galactose. A estabilidade destas ligações é apontada como a responsável pela dificuldade de remoção total da lignina no processo de polpação alcalina (SJÖSTRÖM, 1992).

Na lignina de coníferas, freqüentemente referida como lignina guaiacilica, os elementos estruturais são derivados principalmente do álcool coniferílico (mais de 95% do número total de unidades), seguido pelo álcool p-cumárico e por traços do álcool sinapílico (DENCE E LIN, 1992).

A lignina de folhosas, dita guaiacil-siringilica, é composta por unidades de álcoois coniferílicos e sinapílicos em diferentes relações. Maiores proporções de unidades siringílicas são encontradas devido ao fato da enzima 4-O-metil-transferase de angiospermas ter maior afinidade pelo ácido 5-hidroxi-ferúlico do que a transferase correspondente das gimnospermas (FENGEL E WEGENER, 1989). A lignina de gramíneas é também classificada como guaiacil-siringilica. No entanto, a diferença está no fato de que esta lignina apresenta pequena mas significativa quantidade de elementos derivados do álcool p-cumárico (Figura 8) (DENCE E LIN, 1992).

Os constituintes da lignina apresentam ligações do tipo carbono-carbono e também do tipo éter. A quebra de ligações C-C é difícil de ser obtida sem que se promovam profundas alterações estruturais na lignina. Por outro lado, a solvólise das ligações éter é muito utilizada em estudos estruturais por degradar a lignina a fragmentos que mantêm as características da estrutura original (DENCE E LIN, 1992; FENGEL E WEGENER, 1989).

Os grupos funcionais ligados ao esqueleto fenilpropanóide são de fundamental importância, pois determinam a reatividade da lignina. Entre estes grupos temos: alifáticos, hidroxilas fenólicas, hidroxilas benzílicas, carbonilas e metoxilas. A ocorrência destes grupos pode variar segundo a localização morfológica, espécie de madeira e o método de isolamento (DENCE E LIN, 1992).

1.4. EXTRAÍVEIS

Na madeira, denominam-se extraíveis as substâncias que não estão presas à parede celular, mas que podem ser armazenadas em canais ou entre as células. As madeiras ricas em extrativos apresentam uma grande resistência à biodegradação, proporcionada por estes compostos, mas não estão livres do ataque microbiano realizado por certas cepas de microrganismos (BLANCHETTE, 2000). Um grande grupo de compostos compõem os extraíveis da madeira e estes incluem derivados polifenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico, catequinas e leucoantocianinas. Outros grupos abrangem os terpenos, triacilgliceróis e ésteres de ácidos graxos (HILLIS, 1962).

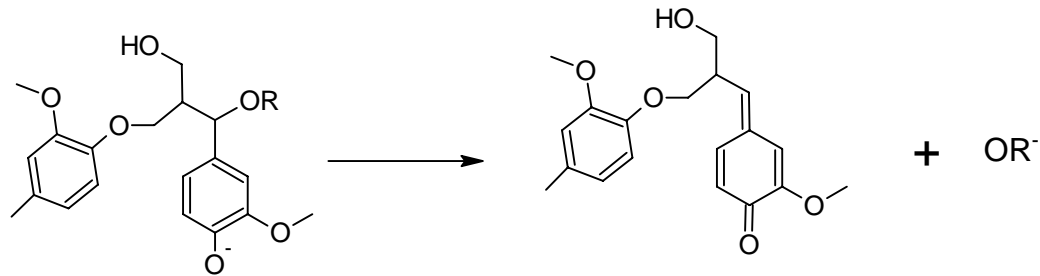
Os extraíveis influenciam diretamente tanto a polpação quanto o branqueamento (PERISSOTO, 2000). Todos estes compostos possuem ligações insaturadas que podem reagir com as substâncias empregadas na polpação. Estas insaturações fazem parte de grupamentos cromóforos que proporcionam coloração à polpa. Os extraíveis dissolvem-se rapidamente no licor de cozimento, diminuem o rendimento da polpação e, concomitantemente, aumentam o consumo de reagentes, já que podem reagir com as espécies ativas do licor (SJÖSTRÖM, 1992).

1.5. POLPAÇÃO KRAFT

A polpa celulósica pode ser obtida da madeira mediante um processo de deslignificação. Atualmente, o processo mais empregado pelas indústrias é o kraft. Nele, os agentes ativos são NaOH e sulfeto de sódio (licor de cozimento). O consumo efetivo de álcali corresponde a 150 kg de hidróxido de sódio por tonelada de madeira (SJÖSTRÖM, 1992). Os cavacos são cozidos no digestor à temperatura de 170°C, que é atingida no seu interior após 50 a 90 min do início da rampa de aquecimento. Com os íons sulfeto (S^{2-}) e bissulfeto (HS^-) presentes no licor, ocorre a quebra de ligações α - e β -aril éter da lignina formando fenolatos solúveis, que são então removidos por lavagem exaustiva na forma do licor negro.

A reatividade nestes sítios de degradação estão dependentes de quais grupos estão ligados a estes carbonos, sendo que ligações α -aril-éter em unidades fenólicas são clivados rapidamente pela conversão destas unidades em seus respectivos quinonametídeos (Figura 10).

FIGURA 10: CLIVAGEM ALCALINA DE LIGAÇÃO α -ARIL ÉTER EM UNIDADES FENÓLICAS ARIL-PROPANO (CHAKAR E RAGAUSKAS, 2004)

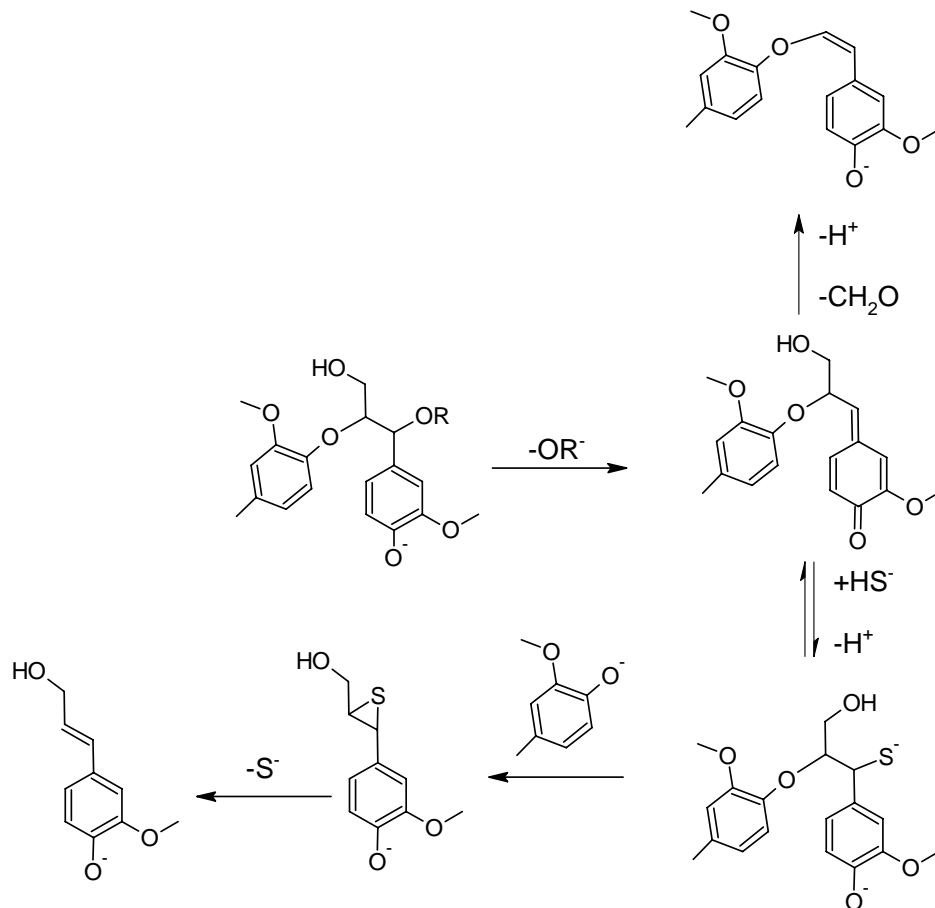


A reação prossegue com a adição de íon hidrosulfeto gerando uma estrutura benzil-mercaptide, que então ataca o C_β formando um intermediário que sofre uma eliminação do grupo β -aril-oxi (Figura 11). Alternativamente, a estrutura quinonemetídeo pode ser convertida em um enol-éter estável em álcali através da eliminação do grupo hidroximetil terminal na forma de formaldeído (CHAKAR E RAGAUSKAS, 2004).

O balanço energético do processo é ajustado pela queima do licor negro na fornalha de recuperação, onde ocorrem reações em que os fenolatos de sódio e os sulfatos se convertem em Na_2CO_3 e sulfetos. Desta forma, o vapor desprendido durante a descarga é utilizado no aquecimento da água consumida na fábrica. No caso de madeiras resinosas, pode-se retirar subprodutos como a terebentina condensando-se os gases de alívio do processo. As principais vantagens da polpação kraft incluem: matéria-prima variável (madeira de folhosas e coníferas), ciclos de cozimento mais curtos, polpa com boas propriedades físico-mecânicas, possibilidade de recuperação de subprodutos (exemplo, terebentina) e o reaproveitamento de licor, com a reciclagem de parte dos reagentes do processo. Dentre as principais desvantagens, o custo na instalação dos equipamentos, a evolução de odores desagradáveis, os baixos índices de alvura na polpa

não branqueada, o custo do processo de branqueamento e o alto impacto ambiental de seus efluentes (D' ALMEIDA, 1988).

FIGURA 11: CLIVAGEM SULFIDOLÍTICA DE LIGAÇÕES β -ARIL ÉTER EM UNIDADES FENÓLICAS ARIL-PROPANÓIDE E CONVERSÃO EM UNIDADES ENOL ÉTER (CHAKAR E RAGAUSKAS, 2004)



As reações com os carboidratos dependem de sua acessibilidade e estrutura. Devido à cristalinidade e alto grau de polimerização, a celulose sofre menor degradação se comparada às hemiceluloses, que são atacadas em temperaturas relativamente baixas. Os grupos acetil são completamente removidos e o “peeling” primário (remoção de

unidades de açúcares a partir da extremidade redutora) é terminado quando a temperatura máxima do processo é atingida (SJÖSTRÖM, 1992).

Assim o licor de cozimento propicia a solubilização de parte do conteúdo das hemiceluloses no licor negro. Temperaturas elevadas também causam a degradação parcial dos polissacarídeos no meio alcalino a carboidratos livres e seus derivados (SCHUERCH, 1963).

Na polpa kraft, observa-se a presença de uma “lignina residual” que pode ser definida como um polímero tridimensional que apresenta ligações condensadas (C-C) e ligações éter entre unidades de estilbeno, difenilmetano e di-hidroxifenil-propiónicas, muitas delas pouco hidrolisáveis. Por outro lado, os extraíveis que ainda se encontram na polpa também podem colaborar na constituição desta “lignina”. Portanto, esta “lignina residual” é significativamente diferente da lignina encontrada na madeira e também da que pode ser obtida no licor negro gerado no processo de polpação kraft (RÍO *et al.*, 2001).

1.6. RECICLAGEM

O consumo elevado de papel em vários setores da economia mundial gera um grande volume de material não aproveitado, fazendo com que a reciclagem seja muito importante sob o ponto de vista ambiental (BNDES, 1995). Tecnicamente, o desenvolvimento de um processo que recupere as propriedades das fibras ainda é um desafio, pois é muito difícil retornar à polpa as suas características originais sem que ocorram perdas substanciais no seu rendimento (CLEVELAND, 1993).

O processo de reciclagem compreende etapas nas quais o papel de partida deve ter suas fibras inicialmente dissociadas e finalmente re-agrupadas. Para a separação, emprega-se água e agentes químicos sob temperatura controlada, adequando-se os materiais de partida em um equipamento que proporcione a dissociação. Os agentes químicos empregados são: hidróxido de sódio, o qual auxilia na remoção de pigmentos e saponifica ácidos graxos; peróxido de hidrogênio, que evita o escurecimento da polpa; sulfeto de hidrogênio, que atua como agente de branqueamento em papéis coloridos; silicato de sódio, que evita o depósito de tintas sobre a polpa; quelantes, que removem metais em solução; e surfactantes, que removem compostos apolares geralmente derivados dos extraíveis. A seguir, a massa obtida é selecionada e o material inapto retornado à etapa inicial de desagregação. A etapa seguinte compreende a secagem do material, onde se realiza um controle rigoroso, pois as propriedades da polpa obtida dependerão do estresse sofrido pelas fibras ao longo desta etapa (CLEVELAND, 1993).

Muitos estudos têm sido orientados à investigação dos efeitos da reciclagem sobre a qualidade de polpas brancas. Por isso, o maior interesse está hoje relacionado às polpas marrons, oriundas da reciclagem de embalagens e destinadas à produção de papéis e papelões. Neste caso, existe uma alta proporção de polpa kraft de fibra longa ainda bastante lignificada (número kappa entre 90 e 100) e, em comparação com outras polpas químicas, as concentrações de hemiceluloses e lignina podem ser particularmente altas (20 e 15%, respectivamente). Portanto, é muito importante saber sobre a composição química e acessibilidade das hemiceluloses e da lignina de fibras recicladas, pois estes fatores influenciam as propriedades da polpa, especialmente a capacidade de associação interfibrilar (NAZHAD E PASZNER, 1994).

Nas fibras recicladas, a perda de propriedades ocorre geralmente no processo de secagem. A maior influência ocorre na morfologia das fibras, pois o seu colapso diminui a acessibilidade da água às hemiceluloses e conduz a alterações na celulose, enrijecendo partes desta cadeia polimérica. Desta forma, a secagem afeta a capacidade de inchamento, a flexibilidade e plasticidade das fibras, sendo irreversível de acordo com a sua drasticidade (SOUZA *et al*, 2003).

Tratamentos alcalinos têm sido analisados como uma alternativa para melhorar a qualidade de polpas recicladas (FREELAND E HRUTFIORD, 1994; GURNAGUL, 1995). Sua ação está exatamente baseada na restauração da acessibilidade das hemiceluloses. Estudos sobre o tratamento alcalino e a reciclagem de papéis corrugados demonstraram que 3% de álcali sobre a polpa melhoraram as suas propriedades de resistência mecânica (CHEN, HEITMANN E CHANG, 1998). No entanto, é de se notar que o tratamento alcalino não é comumente empregado pelas indústrias de reciclagem, pois não se pode evitar que certa quantidade de carboidratos se perca por dissolução, afetando negativamente o rendimento do processo e a qualidade do produto final. Também não se conhecem estudos que relacionem o aumento da afinidade à água e a perda de massa por dissolução, o que resultaria em condições ótimas de tratamento alcalino (GURNAGUL, 1995).

Os tratamentos oxidativos, quando empregados em processos de branqueamento de fibras recicladas, alteram positivamente as propriedades das polpas. Constata-se uma melhora das associações interfibrilares pelo tratamento de fibras recicladas com agentes oxidantes como o ozônio. O uso de espectroscopia Raman e DRIFT (reflectância difusa com transformada de Fourier), assim como a técnica ESCA-XPS (espectroscopia

fotoeletrônica de raios X), permitiram identificar a ação química da oxidação sobre a superfície das fibras recicladas (MINOR, ATALLA E HARTEN, 1993). Frequentemente, observa-se uma inativação da superfície externa da fibra, que pode ser revertida com a ação oxidativa. As alterações químicas nas superfícies das fibras também são mencionadas como condição para o aumento da capacidade de associação interfibrilar (NAZHAD E PASZNER, 1994).

Estudos de branqueamento com peróxido de hidrogênio sobre polpas de abeto, em condições de alta alcalinidade, demonstraram claros efeitos sobre as propriedades físicas da polpa (MOLDENIUS, 1984; ROTHENBERG, SHAW E DURST, 1981). Recentemente, comprovou-se que, para certas condições de tratamento de polpas recicladas, a ação oxidativa do ozônio melhora a sua capacidade de associação interfibrilar, resultando em papéis de melhor qualidade (ZANUTTINI E RUDI, 1997).

1.7. DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Microrganismos capazes de degradar a madeira produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação da parede celular e cada tipo de mecanismo de degradação acarreta diferentes alterações nas propriedades físicas, químicas e morfológicas na madeira biodegradada.

Os fungos que promovem a biodegradação da madeira pertencem à classificação taxonômica dos Basidiomicetos, como fungos da podridão marrom (“brown-rot fungi”) e da podridão branca (“white-rot fungi”), e dos Ascomicetos e Deuteromicetos, que causam a podridão suave (“soft-rot fungi”) (Figura 12). Os fungos da podridão branca são capazes de degradar todos os componentes da parede

celular, e normalmente causam uma descoloração da madeira. Por outro lado, os fungos da podridão marrom despolimerizam a celulose rapidamente nos estágios iniciais da colonização.

O terceiro grande grupo dos fungos que decompõem a madeira, causam a chamada podridão suave e são classificados taxonomicamente nas subdivisões Ascomycetes e Deuteromicetes. São caracterizados por uma degradação superficial da madeira, e podem ser confundidos com os fungos da podridão marrom, apesar de não causarem uma perda de massa muito expressa em seus componentes macromoleculares. Estes fungos principais foram sub-classificados em dois grupos, sendo o primeiro caracterizado por formarem cavidades longitudinais na parede secundária, e o segundo grupo por formarem erosões completas na parede secundária. Geralmente, a lamela média não é degradada, em contraste aos fungos da podridão branca, mas pode atingir altos graus de biodegradação em estágios mais avançados do processo (BLANCHETTE, 2000).

FIGURA 12: FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA, *Trametes hirsuta*.



As enzimas envolvidas nos processos de oxidação da lignina podem ser classificadas como lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacases. Há evidências de que enzimas pertencentes a estas três classes podem agir sobre

componentes de baixa massa molar da madeira que, posteriormente, atuam no processo de oxidação da lignina como mediadores.

As lignina peroxidases possuem massa molar aproximada de 40 kDa, são glicosiladas e apresentam valores de pH ácidos para melhor atuação. O sítio catalítico é formado por um heme Fe-protoporfirínico IX, que é oxidado por H_2O_2 levando a um intermediário deficiente de 2 elétrons, que retorna ao seu estado inicial mediante a oxidação de um substrato doador. Quando atuando em estruturas de lignina, promovem inicialmente a remoção de um elétron da estrutura aromática, gerando um radical arila que reage de forma aleatória para formar uma grande variedade de fragmentos, onde os principais são oriundos da quebra de ligações $C_\alpha-C_\beta$.

As manganês peroxidases são similares as LiP no que diz respeito à glicosilação e condições ótimas de atividade, embora sua massa seja um pouco maior (50-60 kDa). O mecanismo de atuação da enzima está esquematizado na Figura 13, onde é de se destacar que lipídeos insaturados podem atuar como mediadores.

As lacases, benzenodiol:oxigênio oxiredutases ou *p*-difênol redutases (Figura 14), são enzimas dependentes de cobre, com massa molar na faixa de 60-80 kDa, que foram observadas primeiramente no estudo do látex de certas árvores na China e Japão. Estão presentes nos tecidos de vegetais superiores e, também, em microorganismos capazes de processar a madeira (fungos da podridão branca). Foram propostos mecanismos nos quais as lacases, ao lado das peroxidases, promovem a despolimerização da lignina, atuando, portanto, na deslignificação e possibilitando o desenvolvimento do fungo. São importantes na oxidação de anéis aromáticos com substituintes retiradores de elétrons e podem ser inibidas pela presença de ânions que

são capazes de interagir com o sítio dependente de cobre, como azidas, cianidas e tiocianidas (CALL E MÜCKE, 1997).

FIGURA 13: POSSÍVEIS FORMAS DE ATUAÇÃO DAS ENZIMAS LACASES E MnP SOBRE SUBSTRATOS FENÓLICOS.

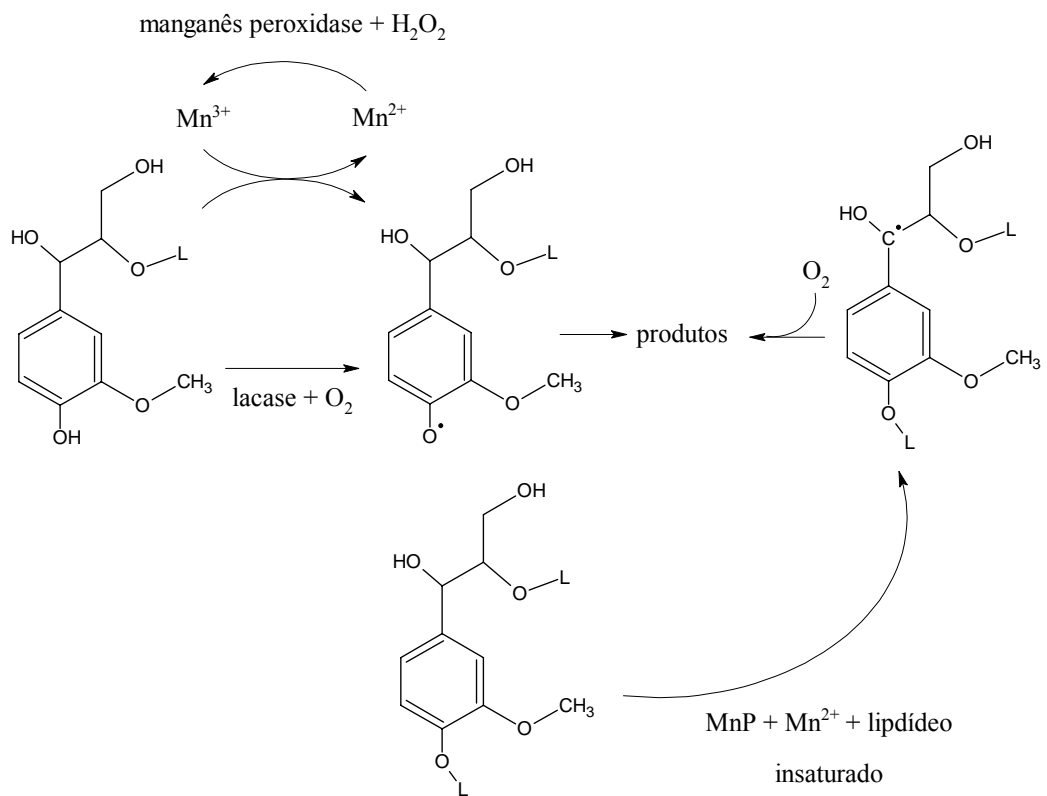
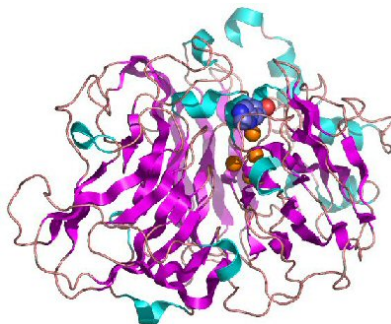


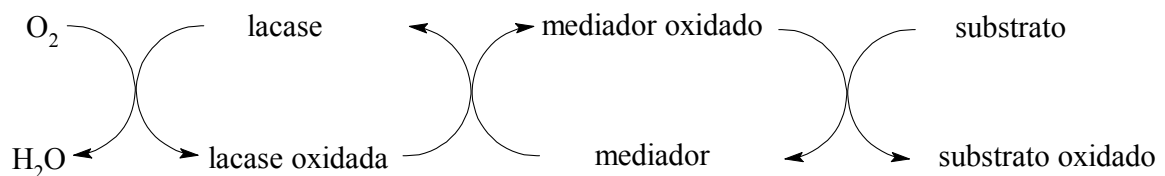
FIGURA 14: ESTRUTURA DE UMA LACASE, COM ÁTOMOS DE COBRE REPRESENTADOS EM VERMELHO



Visando uma melhoria na atuação das enzimas sobre a lignina, desenvolveram-se técnicas nas quais se empregam compostos orgânicos como mediadores. Os mediadores são compostos de massa molar relativamente baixa que são inicialmente oxidados pelas lacases e, posteriormente, oxidam a lignina (Figura 15) (BARRECA *et al.*, 2003).

MOCCHIUTTI, ZANUTTINI e SAPARRAT (2005) constataram que o tratamento de polpas kraft recicladas com lacases sistema mediador (HBT, hidroxibenzotriazol) melhorou as propriedades das fibras hornificadas para a confecção do papel, produzindo corpos de prova de melhor resistência à tração e ao rasgo. No entanto, estes autores não investigaram o efeito que o tratamento enzimático exerceu sobre a composição química dos principais componentes da polpa, celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. Portanto, dada a aparente potencialidade do tratamento enzimático para aumentar a reciclabilidade de polpas kraft, estudos químicos passaram a ser de fundamental importância para a compreensão dos efeitos positivos causados pelas enzimas. A princípio, tais estudos ainda não foram relatados na literatura especializada.

FIGURA 15: ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA LACASE SISTEMA MEDIADOR



2. OBJETIVO

Determinar o efeito que o tratamento enzimático oxidativo, empregando lacases de *Trametes hirsuta* e HBT como mediador, exerce sobre a composição química de fibras de polpa kraft reciclada, visando correlacionar estes efeitos com suas implicações sobre as propriedades físico-mecânicas das fibras. Este objetivo foi alcançado através do seguinte planejamento experimental:

- Obtenção de polpas kraft recicladas de coníferas através do procedimento tradicional de reciclagem e do emprego de oxigênio molecular, na ausência e na presença de lacases-sistema mediador
- Determinação da composição química percentual das polpas recicladas e comparação de seus resultados com a polpa reciclada de referência
- Caracterização do efeito dos tratamentos oxidativos sobre a composição química e estrutural dos carboidratos presentes nas polpas
- Isolamento e caracterização dos extraíveis e da lignina residual presentes nas polpas kraft recicladas ou não pelos processos convencional e oxidativo
- Avaliação da correlação existente entre as propriedades químicas e físico-mecânicas das polpas kraft, antes e após a realização dos processos de reciclagem.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

As análises foram realizadas com uma polpa kraft *liner* não branqueada, cujo número *kappa* correspondeu a 91,6 (Papel Misionero, Santa Fé, Argentina). As lacases empregadas no estudo foram isoladas do fungo *Trametes hirsuta* pela equipe de pesquisadores da VTT Biotechnology (Espoo, Finlândia). Os demais reagentes foram adquiridos no comércio em grau analítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das polpas recicladas

A preparação das polpas recicladas e os tratamentos enzimáticos foram realizados no Instituto de Tecnología Celulósica da Universidad Nacional del Litoral (Santa Fé, Argentina).

A polpa kraft comercial foi umedecida, desintegrada e refinada antes de ser classificada em Bauer McNett, de onde foi selecionada a fração R30. Desta fração foram confeccionados corpos de prova (“handsheets”) de 214 g/m², que foram secos em estufa a 105°C por 1,5 horas. As fibras obtidas pela desintegração dos corpos de prova, doravante denominados como polpa kraft reciclada (PR), serviram para obtenção da polpa reciclada tratada com oxigênio (PRO) e polpa reciclada tratada com sistema lacase-mediador (PROL), como descrito abaixo. Por outro lado, uma amostra da polpa kraft original foi liofilizada para servir como referência ao procedimento analítico (polpa K).

A polpa de referência (polpa PRO) foi derivada do tratamento com oxigênio molecular (borbulhamento) da polpa kraft reciclada, a uma consistência de 2% (m/m), sob agitação e por um período de 4 horas na temperatura de 40°C. A polpa tratada com lacases (polpa PROL) foi obtida em condições idênticas à PRO, exceto pela adição de lacases, em atividade de aproximadamente 15,6 U/g de polpa seca, e do mediador hidroxibenzotriazol (HBT), a 3% (m/m) em relação à polpa seca. A atividade das enzimas foi determinada em pH 5,0, utilizando guaiacol como substrato ($\epsilon_{465\text{ nm}}=12100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Em ambos os casos, foram preparados corpos de prova de 240 g/m², que foram secos a 50°C até peso constante. Finalmente, os corpos de prova foram desintegrados em água sob agitação e as polpas foram secas a temperatura ambiente para dar seqüência aos procedimentos analíticos descritos abaixo.

3.2.2 Determinação da resistência à tração

Estes ensaios foram realizados com os corpos de prova em equipamento de testes universal “Instron”, equipado com um sistema microprocessado e computadorizado de coleta de dados. A norma utilizada foi a TAPPI T 4949 om-96. A distância entre garras no corpo de prova foi de 100 mm, a velocidade do teste de 25 mm/min e a capacidade de carga de 100 ou 1000 N. A energia de deformação dos corpos de prova foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$IR(J/m^2) = \frac{10000A}{L \times La \times G} \quad \text{Equação 1}$$

onde A é a área sobre a curva de força vs. deformação, L é o comprimento da amostra (cm) e La é a largura da amostra (cm) e G é a gramatura da folha ou corpo de prova (ZANDONÁ, 2001).

3.2.3 Isolamento e caracterização dos principais componentes das polpas

Para todos os ensaios, as amostras foram previamente secas à temperatura ambiente e os seus respectivos teores de umidade foram determinados segundo o método gravimétrico tradicional.

3.2.3.1. *Extraíveis*

Uma quantidade conhecida de polpa foi submetida a um processo de extração em aparelho Soxhlet, empregando uma seqüência de solventes na seguinte ordem crescente de polaridade: éter, diclorometano (DCM), etanol 95°:tolueno (1:2 v/v) (ET) e etanol 95°(EtOH), segundo a norma TAPPI T204 om-88, e uma extração em balão de fundo redondo com água fervente, segundo a norma TAPPI T264 om-88. Após cada etapa de extração, o solvente foi removido em evaporador rotativo na temperatura de 45 °C e o resíduo foi seco em balão previamente tarado. Por diferença de massa, o percentual de cada extrato foi calculado em relação à massa seca original de polpa empregada.

3.2.3.2 *Lignina*

Com a finalidade de se obter uma boa quantidade de lignina para caracterização, optou-se por extração em Soxhlet empregando uma mistura de dioxano:HCl 2 mol/L (9:1) por um período mínimo de seis horas. Após a remoção do solvente, as amostras foram suspensas em água e o pH do meio neutralizado com bicarbonato de sódio, para posterior liofilização.

3.2.3.3 *Holocelulose*

A amostra foi suspensa em água destilada e adicionada de ácido acético glacial, acetato de sódio 20% e clorito de sódio 40%. O frasco fechado foi mantido a 75°C por 30 minutos, ao qual foram novamente adicionados o ácido, o acetato e o clorito. Esta operação foi repetida até um tempo total de 2 horas de reação. A porcentagem de holocelulose foi obtida gravimetricamente através da filtração da mistura em cadinho de Gooch já tarado, e o resultado obtido foi expresso em relação à massa seca de polpa (GUERRA, 2002).

3.2.3.4 *Hemiceluloses e α -celulose*

A holocelulose foi tratada com uma solução de hidróxido de potássio a 5% sob atmosfera inerte na temperatura de 25°C por 120 minutos. O material foi filtrado, lavado novamente com a solução alcalina e, posteriormente, com água. O filtrado correspondeu à hemicelulose A, que foi precipitada em proveta com uma solução de etanol:ácido acético (1:1). O material residual foi então tratado com solução de hidróxido de potássio a 24% como descrito anteriormente. O filtrado correspondeu à hemicelulose B, e o material insolúvel à α -celulose. As hemiceluloses foram recuperadas através da centrifugação dos flóculos, seguida por lavagens e centrifugação com água, álcool e éter, sendo transferidas para vidros de relógio previamente tarados. O teor de hemiceluloses foi determinado gravimetricamente em relação a massa original de polpa, enquanto que a α -celulose também foi determinada da mesma forma, após a secagem a 45°C em cadinho previamente tarado (FENGEL E WEGENER, 1989).

3.2.4. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em equipamento Bio-Rad Excalibur FTS 3500GX, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com aquisição de 32 interferogramas para a análise de extraíveis e 64 interferogramas para a caracterização das ligninas, seguida da aplicação da transformada de Fourier. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr com concentração de aproximadamente 1% (PERISSOTO, 1999).

3.2.5. Lignina de Klason

Uma quantidade conhecida de polpa seca e livre de extraíveis foi tratada com ácido sulfúrico 72% em uma temperatura de 20°C, por um período de 1 (uma) hora e agitação ocasional. Após este tempo, o ácido foi diluído até concentração de 3% e a solução aquecida em autoclave (120°C) para hidólise total. Ao término de 1 hora, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch nº2 previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até peso constante e a percentagem de lignina insolúvel em ácido, ou lignina de Klason, foi determinada em relação à massa seca de amostra (GOMIDE E DEMUNER, 1986). O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 250 mL, para a determinação de lignina solúvel em meio ácido por espectroscopia no ultravioleta, empregando a seguinte equação:

$$C(g/L) = \frac{4,53(A_l - A_c)}{300}, \quad \text{Equação 2}$$

onde A_l e A_c corresponde à absorvância em 205 e 280 nm, respectivamente (DENCE E LIN, 1992).

3.2.6. Quantificação da lignina pelo brometo de acetila

As amostras de polpa previamente extraídas com etanol:tolueno (1:2) foram acondicionadas em frascos reacionais, onde foi adicionado brometo de acetila em ácido acético glacial contendo ácido perclórico (70%). Os frascos selados foram mantidos a 70°C por 30 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 mL que continha 10 mL de NaOH 2 mol/L, e o volume foi completado com ácido acético glacial. Para a obtenção do valor de lignina, fez-se leitura em 280 nm e o cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$\text{lignina (\%)} = \frac{100(a-b)V}{Am} - B, \quad \text{Equação 3}$$

onde a e b correspondem a absorvância da amostra e do branco, V é o volume da solução em litros, A é a absortividade da lignina, m é a massa da amostra e B é o fator de correção para o tipo de polpa em estudo (DENCE E LIN, 1992).

3.2.7. Hidroxilas fenólicas da lignina

Para a determinação de hidroxilas fenólicas, empregou-se o método de espectrometria diferencial na região do ultravioleta, que consiste na obtenção de espectros em diferentes condições de pH. Para a obtenção do espectro em meio básico, foi preparada uma solução estoque de lignina (0,5 mg/mL em dioxano 96%) e o pH ajustado a 13 com NaOH 1,0 mol/L, enquanto que o espectro em meio ácido, empregado no zero do aparelho, foi gerado a partir de uma solução com pH ajustado a 1 com HCl 1,0 mol/L. O percentual de hidroxilas fenólicas foi calculado pela equação:

$$\% = \frac{(\Delta 250 \times 0,192)}{C}, \quad \text{Equação 4}$$

onde $\Delta 250$ é a absorvância da solução em 250 nm, subtraída da absorvância relativa a linha de base do espectro, e C é a concentração da lignina em g/L (GUERRA, 2002).

3.2.8. Hidroxilas alifáticas

À amostra (100 mg) foram adicionados 5 mL de mistura ftalante (50 mL de piridina e 5 g de anidrido ftálico) e 2 mL de benzeno. O frasco foi fechado e permaneceu a 80°C por 3 horas. Água foi adicionada após este período, e o frasco permaneceu por mais 10 minutos na temperatura de 80°C. Posteriormente, a amostra foi filtrada em cadinho nº2 e o filtrado titulado com KOH 0,2 mol/L tendo como indicador a fenolftaleína. A porcentagem de OH foi obtida pela equação:

$$\% = \frac{(b-a) \times f \times 170}{m}, \quad \text{Equação 5}$$

onde b e a correspondem aos volumes de KOH gastos na titulação do branco e da amostra, f é a concentração do KOH e m é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.2.9. Grupamentos ácidos

Cerca de 40 mg de lignina foram tratadas com 5 mL de LiOH 0,1 mol/L e 2 mL de etanol em um frasco fechado, que foi acondicionado a 85°C por 3 minutos, seguido da adição de 1 mL de cloreto de bário e repouso até resfriamento. Água foi adicionada até um volume final de 25 mL e, após agitação, foi realizada a centrifugação do material. A 20 mL do sobrenadante foram adicionados 5 mL de HCl 0,1 mol/L e gotas

de vermelho de metila, o excesso de ácido foi titulado com LiOH 0,1 mol/L e a porcentagem de grupamentos ácidos foi calculada segundo a equação:

$$\% = \frac{(b - a) \times f \times 212,5}{m}, \quad \text{Equação 6}$$

onde b e a correspondem ao volume de LiOH gastos na titulação do branco e amostra, f é a concentração do LiOH e m é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.2.10. Carbonilas

Amostras de lignina (80 mg) foram acondicionadas em tubo, onde se adicionou 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 5 mL de mistura oximante (0,2 mol/L $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ e 0,08 mol/L trietanolamina). O tubo foi aquecido a 80°C por 2 horas, sendo o conteúdo transferido quantitativamente a um Erlenmeyer com um mínimo de água. Após este período, o excesso de TEA foi titulado com HCl 0,1 mol/L até pH 3,3 e o teor de carbonilas obtido pela equação:

$$\% = \frac{(b - a) \times f \times 280,1}{m}, \quad \text{Equação 7}$$

onde b e a correspondem ao volume de HCl gastos na titulação do branco e amostra, f é a concentração do HCl e A é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.2.11. Acetilação das ligninas

A cerca de 50 mg de lignina foram adicionados 2 mL de uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v:v) e a mistura foi deixada por 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso de anidrido foi destruído com 13 mL de etanol,

seguido de repouso por 30 minutos. Os solventes foram então evaporados sob baixa pressão e a piridina removida com co-evaporações de metanol. A amostra acetilada foi primeiramente dissolvida em clorofórmio e posteriormente seca contra pentóxido de fósforo e lentilhas de hidróxido de potássio (DENCE E LIN, 1992).

3.2.12. Determinação de carboidratos

Os hidrolisados de Klason foram centrifugados e analisados em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A, detectores modelo RID10A para índice de refração e modelo SPD-M10A para espectrometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, precedida por pré-coluna Cátion-H, com fase móvel H₂SO₄ 8 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glucose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido 2-furóico, hidroximetilfurfural e furfural (ZANDONÁ, 2001).

3.2.13. CPG das amostras de holocelulose

O objetivo da reação de carbamilação (Figura 16) foi o de derivatizar a celulose para posterior cromatografia de permeação em gel (CPG). A polpa de celulose liofilizada (50 mg) foi suspensa em dimetilsulfóxido (3 mL) e então reagida com isocianato de fenila (0,3 mL) em tubos reacionais fechados, por um período de 48 horas, em um bloco de aquecimento a 80°C, com agitação ocasional. Após este período, a mistura resultante foi precipitada em metanol/água (80:20). O precipitado

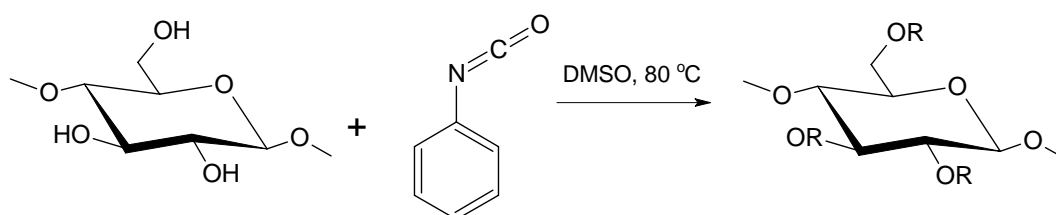
foi lavado três vezes com a solução metanol/água, seco em dessecador sob vácuo contra P₂O₅ e acondicionado em tubos fechados, reservados para posterior análise por cromatografia de permeação em gel (CPG) (RAMOS, 2001). As análises cromatográficas foram obtidas em sistema Shimadzu LC10AD, provido de um detector de rede de fotodiodos SDP-M10A-VP, ajustado no comprimento de onda de 240 nm. As amostras de celulose carbamilada exigiram o emprego de quatro colunas TSK Gel em série, cujos limites de exclusão corresponderam a 4x10⁷, 10⁶, 10⁵ e 10³ u.m.a., respectivamente. As análises foram realizadas a 45°C tendo tetrahidrofurano (THF) como fase móvel, a uma vazão de 1,0 mL/min. O procedimento de injeção foi realizado através de amostrador automático SIL-10A, cujo volume de injeção foi de 20 µL. A massa molar aparente da celulose e das hemiceluloses foi calculada a partir dos volumes de retenção de padrões monodispersos de poliestireno, utilizando o módulo de CPG do software CLASS-LC10 (Shimadzu), sendo que a curva de calibração foi efetuada sobre a análise de padrões monodispersos de poliestireno de massa molar entre 2500 e 1800000 unidades, respectivamente. A partir dos respectivos volumes de retenção apresentados pelos padrões, foi possível traçar uma curva-padrão cuja expressão matemática apresentou um fator de dispersão de 0,028.

O cálculo da massa molar da celulose per-carbamilada foi procedido pelo método de calibração universal, conforme com a seguinte equação:

$$\ln M_c = \frac{(1 + \alpha_p) \ln M_p + \ln(K_p / K_c)}{1 + \alpha_c} \quad \text{Equação 8}$$

Nesse cálculo, foram utilizados os seguintes valores das constantes de Mark-Houwink: $\alpha = 0,92$ e $k = 2,01 \times 10^{-5}$ para a celulose per-carbamilada e $\alpha = 0,74$ e $k = 1,18 \times 10^{-4}$ para o poliestireno, ambos em THF. Assim, baseados na curva de calibração dos padrões de poliestireno, foi possível calcular o número molar médio (ou média aritmética das massas molares, MM_N) e a massa molar média (ou média ponderada das massas molares, MM_M) da celulose per-carbamilada, sendo que o grau de polimerização (GP) foi determinado pela relação de $GP = MM/519$. Por fim, a razão MM_M/MM_N foi utilizada como medida da polidispersidade da polpa, que representa o desvio padrão da distribuição em torno de seu ponto central.

FIGURA 16: REAÇÃO DE CARBAMILAÇÃO DA CELULOSE EMPREGANDO ISOCIANATO DE FENILA



Para as análises de CPG de amostras de lignina, foram utilizados os seus respectivos derivatizados acetilados dissolvidos em THF. As análises foram realizadas nas mesmas condições cromatográficas empregadas para análise da celulose carbamilada, somente que restringindo as colunas às de limites de exclusão de 4×10^6 , 10^4 e 10^3 u.m.a.

3.2.14. Cinzas

Uma quantidade conhecida de polpa foi acondicionada em um cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, sendo então calcinada em mufla a uma

temperatura de 525°C por um período de uma hora. O teor de cinzas foi obtido através da relação de diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa como cinzas em relação à quantidade de amostra inicial (PERISSOTO, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma polpa kraft “liner” de *Pinus* sp., com número *kappa* de 91,6, foram produzidos corpos de prova (folhas de teste ou “handsheets”) para simulação do processo de produção de papéis kraft para embalagens. Estas folhas de teste foram então desintegradas, gerando uma polpa de fibras recicladas (polpa PR) que serviu para os testes com sistemas oxidativos empregando oxigênio (polpa PRO) e oxigênio/sistema lacase-mediador (polpa PROL). Posteriormente, corpos de prova de 60 g/m² foram preparados em laboratório, a partir das polpas modificadas quimicamente (polpas PRO e PROL), para avaliar o efeito do tratamento enzimático sobre a resistência à tração. As polpas PRO e PROL apresentaram resistências à tração de 30,8 e 33,7 Nm/g, enquanto que o valor de referência para a polpa kraft de origem foi 44,5 Nm/g. Isto significa que, embora não tenha sido possível regenerar o valor originalmente observado na polpa virgem, o uso de lacases melhorou em 9,4% a resistência à tração das fibras recicladas (vide polpa PRO). Neste trabalho, a composição química das polpas supramencionadas foi caracterizada para identificar os fatores químicos e/ou estruturais que justificariam a melhora observada no comportamento físico-mecânico. Para tal, amostras foram obtidas a partir da desintegração de folhas de teste, preparadas a partir das polpas PR, PRO e PROL em condições padronizadas. Estas amostras foram então submetidas à caracterização química para avaliar o efeito que o tratamento enzimático oxidativo, empregando lacases de *T. hirsuta* na presença do mediador hidroxibenzotriazol (HBT), exerceu sobre a composição química e estrutural dos principais componentes da polpa kraft empregada neste estudo.

4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS POLPAS

A análise preliminar da composição química das polpas em estudo encontra-se na Tabela 1. Estes resultados revelaram que o tratamento enzimático oxidativo não acarretou quaisquer alterações significativas no teor de holocelulose, lignina de Klason e materiais inorgânicos (cinzas) da polpa kraft, com exceção dos valores obtidos para o teor de extraíveis. Por outro lado, foi possível observar que o teor de holocelulose das polpas recicladas foi inferior ao da polpa kraft e que o tratamento com oxigênio proporcionou menores diferenças para este valor. Por outro lado, os valores totais da Tabela 1 que se apresentaram ligeiramente superiores a 100 % foram associados à contaminação parcial da holocelulose com lignina não extraída pelo tratamento das polpas com clorito de sódio em meio ácido. Esta hipótese foi comprovada pela determinação de lignina de Klason na holocelulose isolada das polpas, cujos resultados indicaram a presença de lignina total em teores médios de 2,3 % (m/m). Assim, os teores de holocelulose registrados na Tabela 1 estão superestimados em aproximadamente 2 %, o que justificaria os totais observados na análise somativa. No entanto, considerando as dificuldades analíticas inerentes ao processo de deslignificação, de que depende o isolamento da holocelulose, os resultados apresentados na Tabela 1 foram considerados representativos da composição percentual das polpas em relação a estes quatro componentes.

A Tabela 1 sugere que houve um pequeno aumento do teor de lignina total nas polpas PRO e PROL, em relação às polpas PR e kraft original. No entanto, este aumento parece ter sido devido exclusivamente ao aumento da lignina solúvel em

ácido, pois os teores de lignina insolúvel em ácido apresentaram-se constantes para todas as polpas envolvidas neste ensaio (Tabela 2).

TABELA 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS POLPAS KRAFT, KRAFT RECICLADA (PR) E KRAFT RECICLADA TRATADA COM OXIGÊNIO NA AUSÊNCIA (PRO) E PRESENÇA DE LACASES-SISTEMA MEDIADOR (PROL)

Polpa	Holocelulose (%)	Lignina de Klason (%)	Extraíveis (%)	Cinzas (%)	Total (%)
Polpa kraft	84,09 ± 0,41	12,94 ± 0,10	1,11 ± 0,33	0,90	99,04
PR	82,78 ± 0,11	12,90 ± 0,39	1,70 ± 0,45	1,00	98,38
PRO	83,08 ± 0,23	14,15 ± 0,67	3,11 ± 0,68	0,66	101,00
PROL	83,61 ± 0,14	13,41 ± 0,57	4,15 ± 0,18	0,64	101,31

TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO DA LIGNINA PRESENTE NAS POLPAS PELOS MÉTODOS DE KLASON E DO BROMETO DE ACETILA

Amostra	Lignina de Klason ^a			Lignina AcBr ^b
	insolúvel	solúvel	total	
kraft	11,20 ± 0,15	1,74 ± 0,05	12,94	13,59 ± 1,53
PR	11,14 ± 0,22	1,76 ± 0,21	12,90	nd
PRO	11,41 ± 0,92	2,74 ± 0,46	14,15	13,14 ± 1,07
PROL	11,18 ± 0,55	2,23 ± 0,05	13,41	12,56 ± 0,25

PR, polpa kraft reciclada; PRO, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio; PROL, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio na presença de lacases-sistema mediador; nd, não determinado

^a medidas em triplicata

^b medidas em duplicata

O teor de lignina insolúvel em ácido, obtida pelo procedimento de Klason, não apresentou alterações significativas para as diferentes amostras. Embora estas variações tenham sido de pouca relevância, esperava-se que o tratamento com lacases

influenciasse a contribuição percentual da lignina na polpa, gerando um ligeiro decréscimo da lignina insolúvel em ácido acompanhado por um ligeiro aumento do teor de lignina solúvel em ácido. No entanto, o tratamento oxidativo, quer realizado na presença (polpa PROL) ou na ausência (polpa PRO) de lacases, determinou ocasionou apenas um aumento considerável do teor de lignina solúvel em ácido em relação à polpa original.

Os resultados apresentados na Tabela 2 permitem observar que houve uma relação muito próxima entre as quantidades de lignina total determinadas pelos procedimentos de Klason e do brometo de acetila. Todavia, o segundo procedimento não só reiterou como reforçou a evidência de que o tratamento enzimático oxidativo reduziu o teor de lignina total da polpa reciclada, em relação à polpa kraft original.

WONG, ANDERSON e KIBBLEWHITE (1999) realizaram um estudo sobre as propriedades de corpos de prova obtidos de polpa kraft de coníferas, cujo número *kappa* era de 95. Estes autores inicialmente constataram um teor de 15,5 % de lignina insolúvel em ácido na polpa kraft e, ao submeter esta polpa a um tratamento com lacase-sistema mediador, não observaram qualquer alteração que pudesse ser atribuída ao tratamento enzimático oxidativo. No entanto, o número *kappa* sofreu uma queda de 8 a 11 unidades em relação ao controle, sugerindo que o efeito do sistema enzimático não se restringiu à despolimerização oxidativa da lignina presente na polpa.

Diferentemente dos outros componentes da polpa kraft, os extraíveis totais apresentaram uma alteração bastante significativa em decorrência dos tratamentos oxidativos. É importante ressaltar que, neste estudo, os extraíveis totais representam a somatória dos teores obtidos nas extrações sequenciais com éter, diclorometano,

etanol:tolueno 1:2 (v/v), etanol 95° e água quente. A atuação do sistema oxidativo, quer enzimático ou não, provavelmente gerou fragmentos de lignina de menor massa molar que foram passíveis de extração pelos solventes empregados. No entanto, a mistura etanol:tolueno foi a que apresentou o maior aumento em sua capacidade de solubilizar os extraíveis da polpa, sugerindo que estes devem corresponder a estruturas oxidadas (portanto, de maior polaridade) oriundas da degradação parcial de complexos lignina-carboidrato e outros constituintes da polpa.

É interessante observar que o tratamento da polpa kraft com oxigênio molecular, na presença do sistema lacases-mediador, acarretou um aumento superior no teor de extraíveis totais (Tabela 3), em comparação com o experimento controle (polpa PRO). Portanto, as enzimas aparentemente aumentaram a seletividade do processo oxidativo.

Houve também um aumento considerável no teor de material extraído com água a quente, que foi maior para a polpa PROL. Esta observação também está relacionada à maior seletividade do processo oxidativo, neste caso observado através do aumento da solubilidade em água de componentes de baixa massa molar da polpa e à eventual geração de oligômeros solúveis provavelmente oriundos de complexos lignina-carboidrato.

De um modo geral, o teor de extraíveis de madeiras de coníferas encontram-se na faixa de 2 a 5 %, enquanto que o teor de extraíveis em polpas kraft derivadas de coníferas são de aproximadamente 0,1 % para compostos neutros (DENCE E REEVE, 1996). No entanto, não há dados na literatura para extraíveis empregando os solventes utilizados neste trabalho.

TABELA 3: COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS EXTRAÍVEIS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS

Polpa	Éter ^b	DCM ^b	ET ^b	EtOH ^b	AQ ^b	Total
Polpa kraft	0,13 ± 0,03	0,35 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,45 ± 0,17	0,53 ± 0,05	1,11
PR	0,27 ± 0,15	0,31 ± 0,08	0,91 ± 0,06	0,29 ± 0,15	0,58 ± 0,04	1,70
PRO	0,13 ± 0,02	1,19 ± 0,52	0,72 ± 0,01	0,71 ± 0,18	0,36 ± 0,04	3,11
PROL	0,20 ± 0,03	0,32 ± 0,09	1,84 ± 0,08	0,56 ± 0,02	1,23 ± 0,02	4,15

PR, polpa kraft reciclada; PRO, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio; PROL, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio na presença de lacases-sistema mediador; DCM, diclorometano; ET, etanol:tolueno (1:2); EtOH, etanol; AQ, água quente

^b medidas em duplicata

4.2. COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS

A composição polissacarídica das polpas em estudo encontra-se discriminada na Tabela 4, onde se percebe um aumento aparente no teor das hemiceluloses, apesar do alto desvio padrão que caracterizou este procedimento analítico. É importante ressaltar que as frações hemicelulósicas A e B, bem como a α -celulose, foram determinadas a partir da holocelulose e que a eventual contaminação desta com lignina pode ter interferido na determinação quantitativa destes três componentes. Por esta razão, os valores registrados na Tabela 4 foram expressos em relação à massa seca de polpa inicialmente submetida ao processo de extração, eliminando parcialmente o artifício causando pelas dificuldades no processo de isolamento das holoceluloses.

O procedimento de reciclagem tomado como referência (polpa PR) causou um aumento significativo no teor de hemicelulose B da polpa kraft, acompanhado de um pequeno decréscimo no teor de hemicelulose A. Este efeito dever ter sido decorrente do processo de hornificação das fibras, que diminui a acessibilidade química das hemiceluloses à extração alcalina. Efeitos químicos em paralelo, como a desacetilação

das hemiceluloses, também poderiam justificar este comportamento, mas a análise cromatográfica dos hidrolisados não evidenciou tal tendência. Por outro lado, o tratamento oxidativo, quer enzimático ou não, parece ter restabelecido a acessibilidade das hemiceluloses, com um aumento relativo da hemicelulose A, mas tal conclusão foi dificultada pelo alto desvio padrão apresentado pelo método.

TABELA 4: ANÁLISE GRAVIMÉTRICA DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DAS POLPAS EM ESTUDO EM RELAÇÃO À MASSA SECA

Polpa	Hemicelulose (%) ^b			α -Celulose (%) ^b
	A	B	total	
Polpa kraft	5,49 \pm 0,30	4,80 \pm 1,40	10,29	73,84 \pm 2,56
PR	4,46 \pm 0,06	8,52 \pm 0,74	12,98	73,31 \pm 0,28
PRO	6,94 \pm 1,62	6,21 \pm 2,82	13,15	70,82 \pm 0,59
PROL	7,14 \pm 1,79	6,40 \pm 2,98	13,54	73,23 \pm 0,51

PR, polpa kraft reciclada; PRO, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio; PROL, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio na presença de lacases-sistema mediador

^b medidas em duplicata

É de se notar que o teor de α -celulose, determinado na polpa reciclada na presença de oxigênio molecular (PRO), apresentou um valor menor do que as demais polpas. Comparando-se com dados da literatura (Dence e Reeve, 1996), os teores de α -celulose nas polpas estão um pouco abaixo dos 80,1 % usualmente relatados para polpas kraft de coníferas.

A média ponderada do grau de polimerização (GP_M) das holoceluloses isoladas dos diferentes tipos de polpas kraft apresentaram-se muito próximos entre si (Tabela 5). É perceptível que a polidispersidade (que representa a variação do grau de polimerização em relação à média da população) da holocelulose isolada da polpa

PRO apresentou valor inferior aos obtidos para as demais holoceluloses. Este fato também pode ser visto no perfil de eluição cromatográfica descrito na Figura 16, onde o pico correspondente aos polissacarídeos de menor massa molar diminuiu em relação ao controle. Este fato está provavelmente associado ao processo de reciclagem da polpa, que envolve etapas de dissociação dos corpos de prova, tratamento oxidativo com oxigênio molecular, re-agrupamento das fibras em um novo corpo de prova (com perdas de finos e compactação) e secagem da folha de teste em condições padronizadas. Interessantemente, o emprego de sistema lacases-mediador reverteu o efeito causado pela hornificação e/ou oxidação química das fibras, como demonstra o perfil da distribuição obtida por cromatografia de exclusão (Figura 17).

TABELA 5: GRAU DE POLIMERIZAÇÃO MÉDIO E POLIDISPERSIDADE DA HOLOCELULOSE ISOLADA

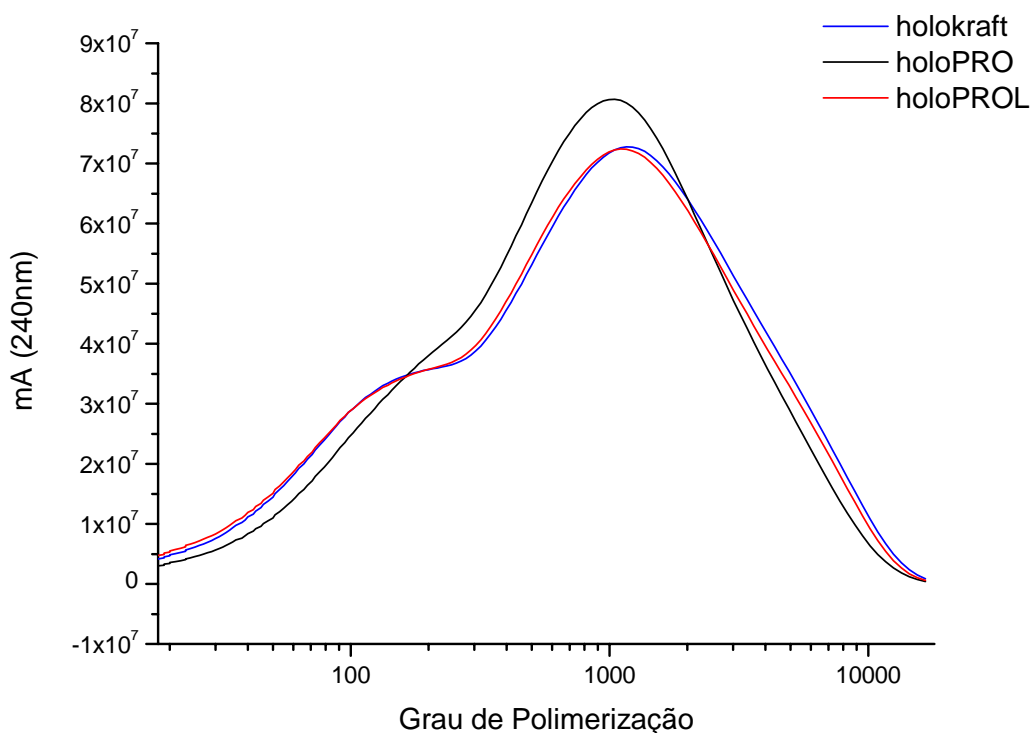
Amostra	GP_M	GP_N	GP_M/GP_N
Holocelulose kraft	1083	103	10,62
Holocelulose PRO	979	141	6,94
Holocelulose PROL	1028	95	10,89

PRO, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio; PROL, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio na presença de lacases-sistema mediador

É interessante observar que a holocelulose da polpa PROL apresentou praticamente o mesmo perfil da holocelulose da polpa kraft original, sugerindo que as enzimas, de alguma forma, preservaram a integridade dos carboidratos presentes na polpa. No entanto, a diferença entre os perfis foi relativamente sutil, o que pode significar que a ação enzimática oxidativa tem pouca influência sobre os componentes celulósico e hemicelulósico da polpa. Neste caso, as diferenças registradas nas Tabelas

1 e 2 estariam unicamente relacionadas ao erro dos métodos quantitativos empregados para análise, agravado pela diferente acessibilidade que as polpas kraft, PR, PRO e PROL apresentaram aos reagentes utilizados no procedimento analítico.

FIGURA 17: GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS HOLOCELULOSES OBTIDAS DE POLPAS KRAFT, PRO E PROL



A Tabela 6 apresenta a composição das polpas em carboidratos, determinada nos hidrolisados ácidos de Klason por cromatografia de fase líquida. Os resultados revelaram um pequeno decréscimo na quantidade de glucanas (celulose) e um leve decréscimo na quantidade de hemiceluloses. Através desta análise, também se nota que a quantidade de hidroximetilfurfural e furfural para as polpas oxidadas é maior em relação às polpas não submetidas a este processo. Isto confirma a hipótese de que o

tratamento com oxigênio e oxigênio/sistema lacase-HBT aumenta a acessibilidade química das hemiceluloses, levando a uma maior degradação destes carboidratos (desidratação). Interessantemente, os valores quantitativos dos carboidratos determinados em corpos de prova (folhas de teste ou “handsheets”) da polpa kraft reciclada (polpa PR na Tabela 6) foram muito próximos aos determinados para a polpa kraft original. Deste modo, os resultados desta análise sugerem que a formação de folhas a temperaturas elevadas não causa um efeito significativo sobre o teor de carboidratos da polpa, e as diferenças observadas anteriormente eram realmente devidas à diferenças de acessibilidade das polpas às soluções de extração. Através do método de análise cromatográfica, o teor de hemiceluloses totais das polpas kraft e PR estão de acordo com DENCE e REEVE (1996) (17 %), enquanto que as polpas submetidas ao processo de reciclagem (polpas PRO e PROL) apresentaram valores superiores. Uma característica importante observada nos cromatogramas da Figura 18 é a ausência quase total de ácido acético (retenção de 15,2 minutos), sugerindo que as hemiceluloses foram desacetiladas durante o processo de obtenção da polpa.

Como dito anteriormente, houve uma diferença marcante entre os resultados obtidos para o teor de hemiceluloses através do método gravimétrico (hemiceluloses A e B, Tabela 4) e do método cromatográfico (Tabela 6). Neste sentido, é importante ressaltar que o procedimento gravimétrico não assegura que cada fração seja obtida sem qualquer contaminação cruzada, e que, portanto, a α -celulose isolada não tenha retido parte das hemiceluloses originalmente presentes na polpa. Dados preliminares indicaram que a α -celulose pode reter até 10% de seu peso em hemiceluloses, o que explica a discrepância observada.

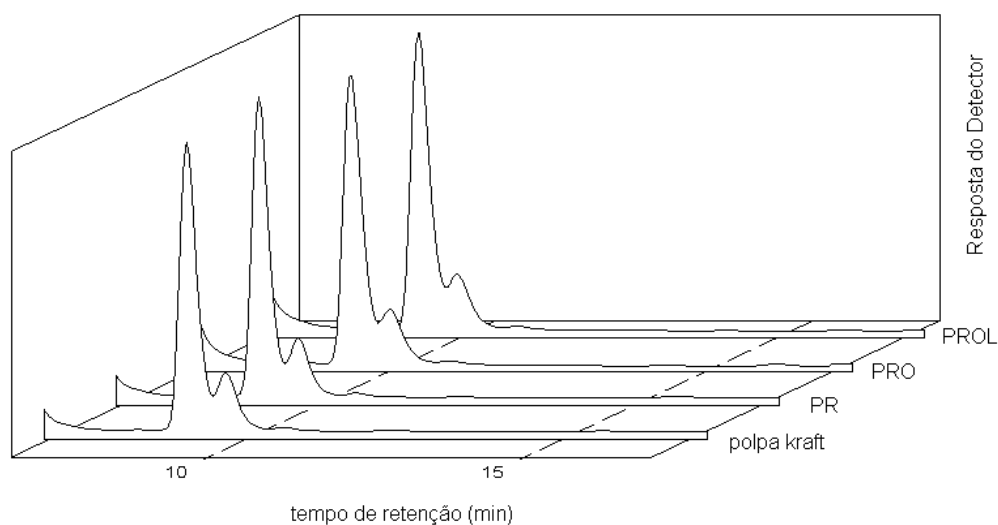
TABELA 6: COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS CARBOIDRATOS CONSTITUINTES DAS POLPAS

Componente (%)	Polpas kraft ^a			
	K	PR	PRO	PROL
Glucana	70,60 ± 2,48	68,92 ± 2,35	68,75 ± 2,75	68,16 ± 2,13
Xilana	14,26 ± 1,02	14,04 ± 0,87	13,05 ± 0,46	12,80 ± 1,10
Arabinosil	1,61 ± 0,36	1,57 ± 0,29	1,51 ± 0,18	1,56 ± 0,22
HexA	0,015 ± 0,002	0,014 ± 0,002	0,041 ± 0,023	0,041 ± 0,009
Furfural	0,542 ± 0,034	0,522 ± 0,066	1,356 ± 0,350	1,358 ± 0,179
Hidroximetilfurfural	0,129 ± 0,011	0,126 ± 0,008	0,123 ± 0,016	0,131 ± 0,014
Total	86,54	84,09	82,98	81,35

PR, polpa kraft reciclada; PRO, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio; PROL, polpa kraft reciclada tratada com oxigênio na presença de lacases-sistema mediador

^a medidas em triplicata

FIGURA 18: CROMATOGRAMAS DOS HIDROLISADOS DE KLASON COM DETECTOR POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO



A determinação de ácido hexenurônico foi realizada com base na análise cromatográfica do ácido 2-furóico (Figura 19), cujo tempo de retenção foi de 29,8 min, empregando detecção por espectrometria no ultravioleta em 252 nm. Aparentemente, o tratamento oxidativo da polpa não acarretou modificação significativa em seu teor. Por outro lado, este mesmo cromatograma mostrou que a intensidade do pico para o furfural foi maior para as polpas recicladas, quando comparadas às polpas kraft e PR, sugerindo que o processo de reciclagem aumentou a susceptibilidade das hemiceluloses à hidrólise ácida e subsequente desidratação. Este conceito estaria de acordo com a hipótese da perda de acessibilidade discutida anteriormente.

FIGURA 19: CROMATOGRAMAS DOS HIDROLISADOS DE KLASON COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA EM 252 nm

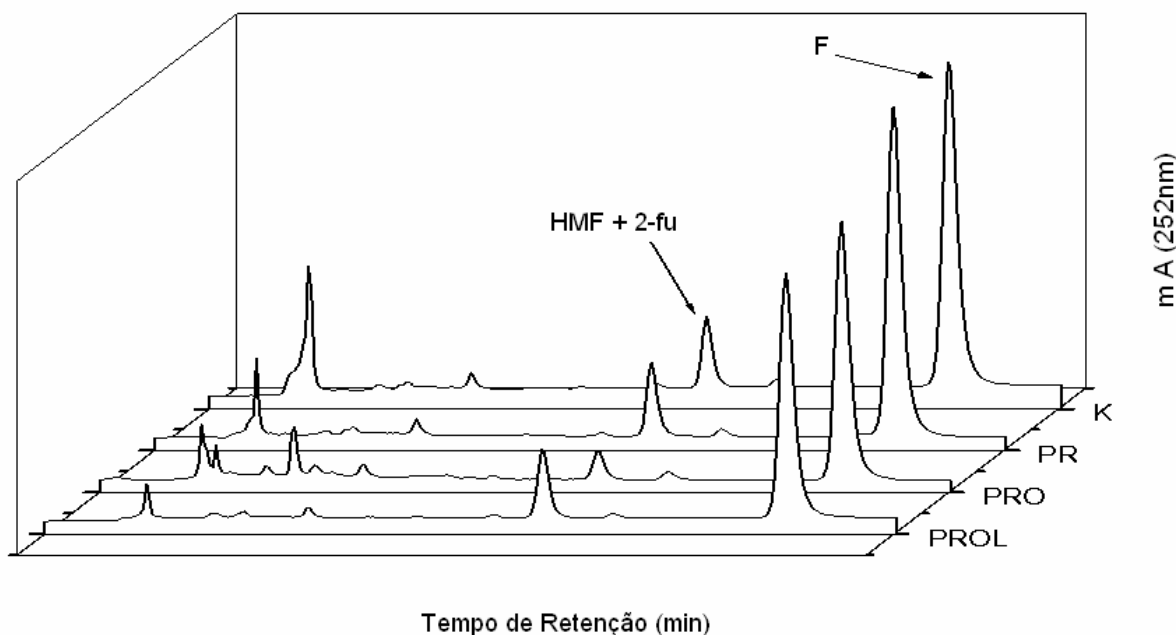
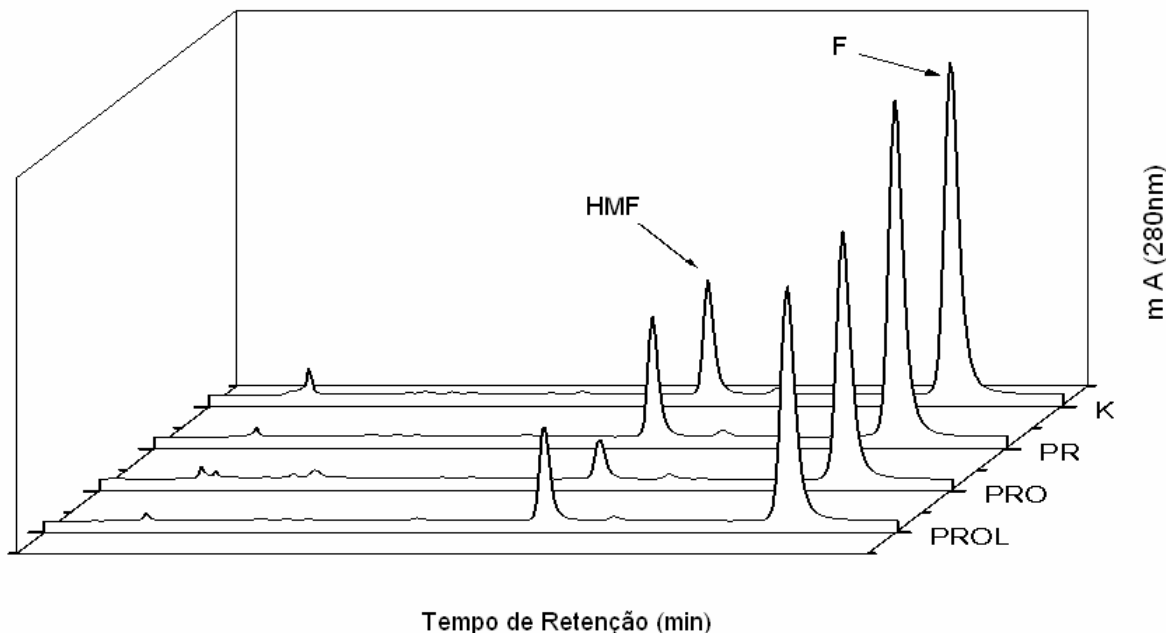


FIGURA 20: CROMATOGRAMAS DOS HIDROLISADOS DE KLASON COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA EM 280 nm



Uma hipótese para justificar o comportamento favorável do sistema enzimático oxidativo está relacionado à disponibilidade de oxigênio molecular no meio reacional. Ao adicionar lacases no processo oxidativo de reciclagem, parte do oxigênio injetado no sistema é consumido pela enzima para oxidar o mediador que, em última análise, será responsável pela oxidação da lignina e de outros componentes da polpa que apresentem susceptibilidade a esta reação. Assim, haveria menor disponibilidade de oxigênio molecular para a geração de radicais livres que, sabidamente, comprometem a fração polissacarídica das polpas devido a inespecificidade de sua ação oxidativa. Portanto, as enzimas atuam como fator para aumentar a especificidade do processo, modificando a superfície das fibras sem acarretar perdas significativas de celulose e hemiceluloses.

4.3. COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRAÍVEIS

Os espectros no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) dos extraíveis isolados das polpas com diferentes solventes foram bastante similares entre si, apesar de que algumas diferenças importantes puderam ser detectadas nesta análise.

Nos espectros em DCM (Figura 21), foi observada a presença predominante de compostos alifáticos esterificados e álcoois, possivelmente oriundos de ésteres de ácidos graxos e terpenos. As principais bandas atribuídas são as deformações axiais de O-H em 3425 cm^{-1} e de C-O em álcoois primários (1072 cm^{-1}). As cadeias alifáticas são caracterizadas pelas deformações axiais de C-H em grupos CH_3 e CH_2 em 2954 e 2872 cm^{-1} (assimétrico) e 2924 e 2852 cm^{-1} (simétrico), e deformações angulares de C-H em CH_3 em 1462 e 1377 cm^{-1} (assimétricas e simétricas, respectivamente). A banda na região de 1737 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de C=O de ésteres alifáticos (não conjugados), confirmado pela banda do esqueleto (C=O)-O-C em 1261 cm^{-1} .

Nos espectros de FTIR da fração etanol:tolueno (1:2) (Figura 22), a presença de compostos aromáticos é mais clara. Também se percebe a presença de álcoois com deformação axial de O-H em 3435 cm^{-1} , deformação axial de =C-H em 3055 cm^{-1} , vibrações de anel aromático em 1614 e 1514 cm^{-1} , deformação C-H no plano em 1028 cm^{-1} e fora do plano em 802 cm^{-1} , sendo que o perfil sugere anel aromático (1-4)-di-substituído. A presença de ésteres é denotada pelas bandas em 1739 , 1261 e 1097 cm^{-1} , sendo atribuídas da mesma forma que as bandas observadas nos espectros dos extratos obtidos em diclorometano.

FIGURA 21: ESPECTROS POR IVTF DOS EXTRAÍVEIS EM DICLOROMETANO (DCM) DAS POLPAS KRAFT, PRO E PROL

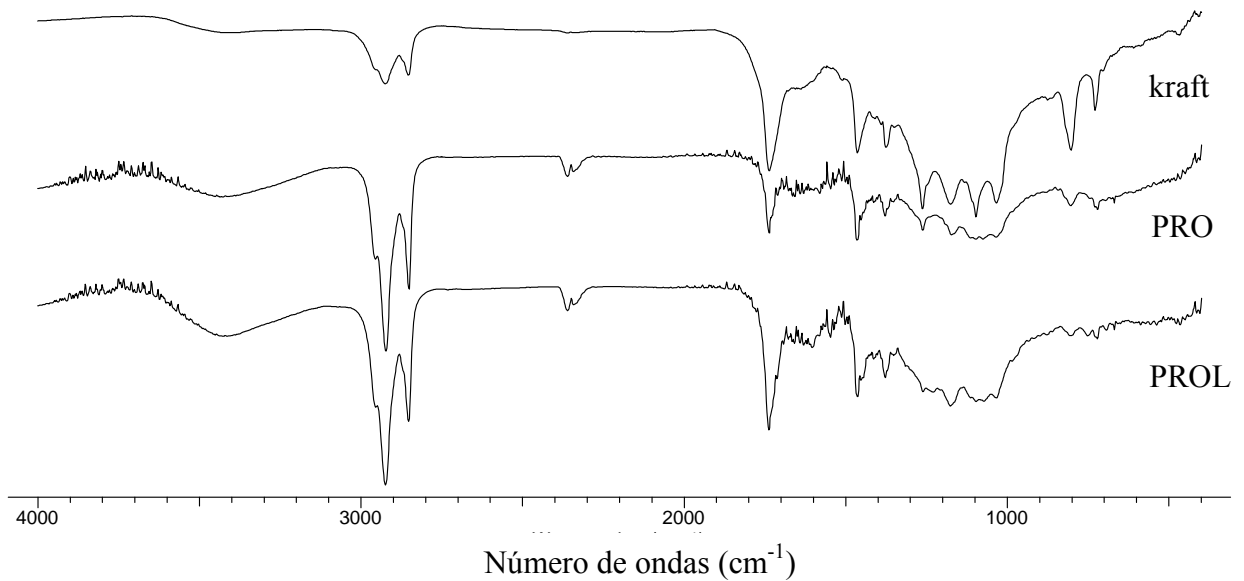
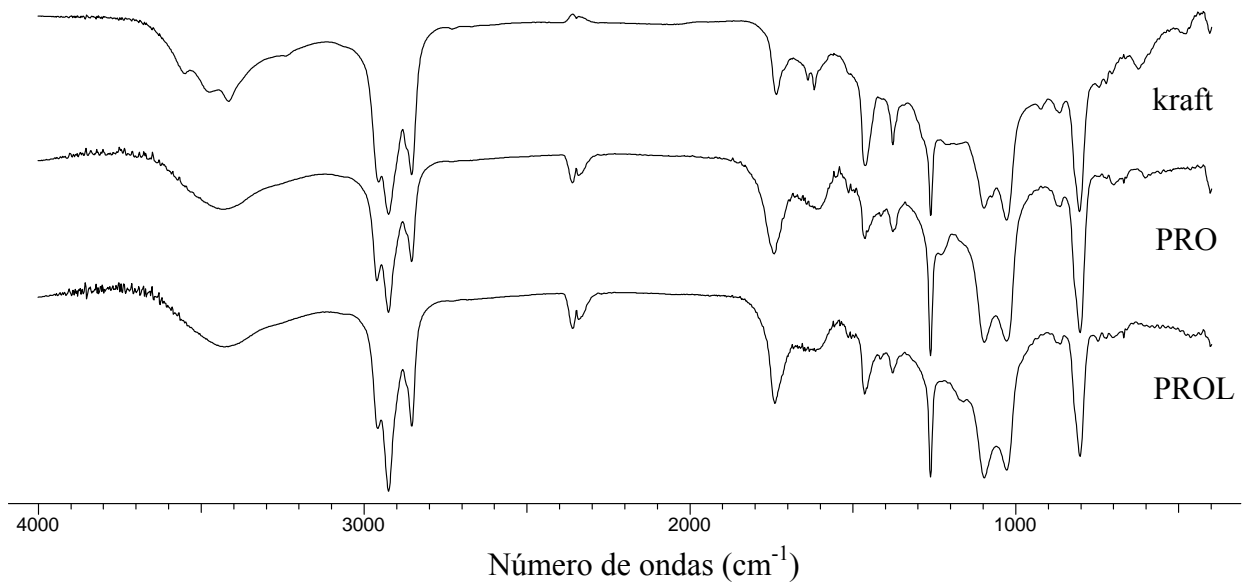


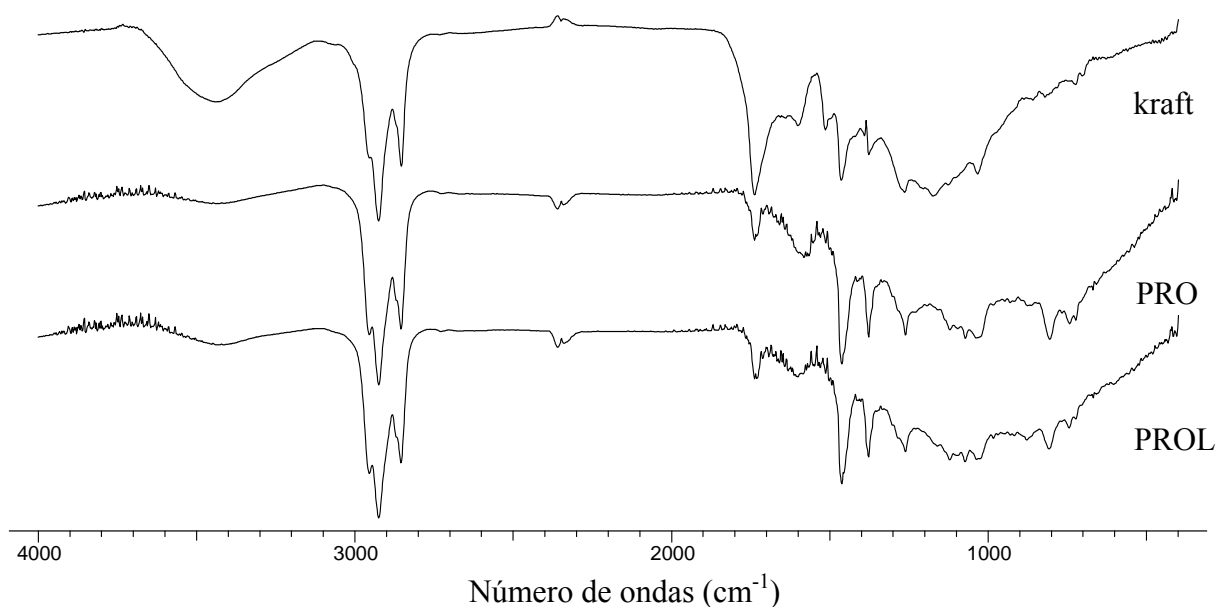
FIGURA 22: ESPECTROS POR IVTF DOS EXTRAÍVEIS EM ETANOL:TOLUENO DA POLPA KRAFT, PRO E PROL



Os espectros obtidos com etanol 95° (Figura 23) não diferiram muito dos já citados, sendo que as principais diferenças corresponderam à baixa intensidade da banda de deformação axial de C=O de ésteres alifáticos nos extratos das polpas PRO e

PROL. Também foi constatado que a polaridade dos componentes que perfazem a fração etanol 95° provavelmente diminuiu após o tratamento oxidativo da polpa PR, seja na presença ou na ausência das lacases de *T. hirsuta* e do mediador HBT.

FIGURA 23: ESPECTROS POR IVTF DOS EXTRAÍVEIS EM ETANOL 95° DAS POLPAS KRAFT, PRO E PROL



4.4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS LIGNINAS

A lignina isolada por acidólise em dioxano:HCl é considerada como representativa da lignina residual presente em polpas, embora pequenas mudanças ainda possam ocorrer durante o processo de isolamento. Por esta razão, este método foi selecionado para extrair as ligninas residuais das polpas kraft, PRO e PROL

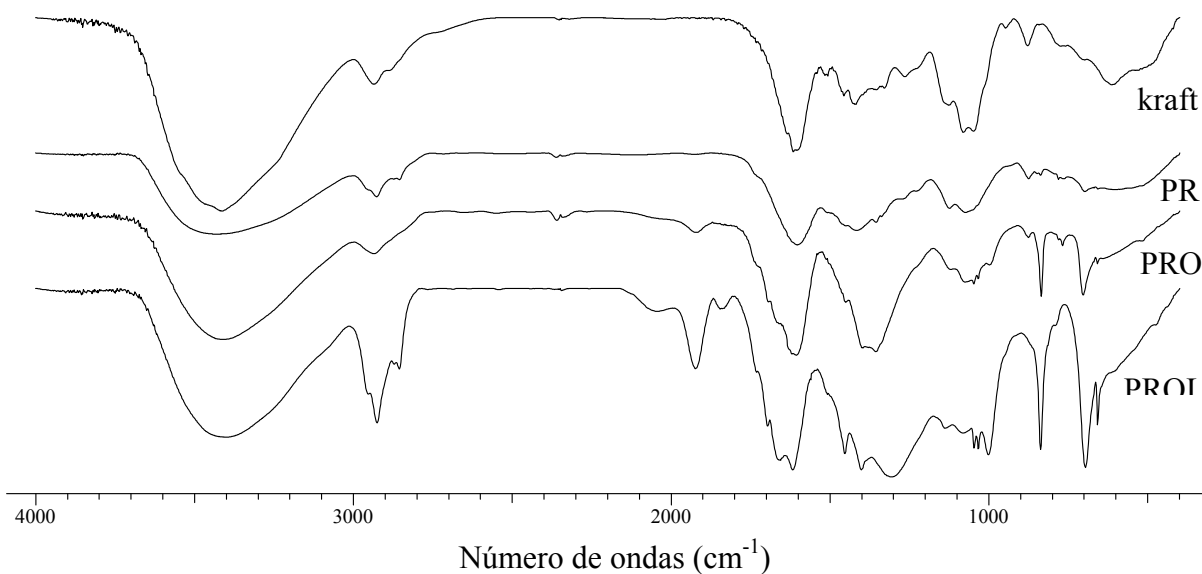
A extração foi realizada em Soxhlet empregando uma solução dioxano:HCl, 9:1 (v/v), cuja acidez final era de 0,2 mol/L. Os rendimentos brutos deste procedimento de extração corresponderam a 7,0% para a polpa kraft, 13,1% para a polpa PRO e 17,9%

para a polpa PROL, sempre expressos em relação à massa seca de polpa submetida ao procedimento experimental. Comparados aos seus respectivos teores de lignina total (Tabelas 1 e 2), a acidólise permitiu o isolamento de 54, 93 e 134% da lignina presente nas polpas kraft, PRO e PROL, respectivamente, sugerindo que, principalmente no caso da polpa PROL, o procedimento de extração resultou na contaminação parcial das amostras com carboidratos e também, possivelmente, por extraíveis.

Embora a literatura discorra sobre uma grande variedade de métodos de purificação de lignina, baseados principalmente na sua precipitação após solubilização integral em solvente adequado, nenhum procedimento foi empregado até o momento para eliminar as contaminações provavelmente presentes nas ligninas isoladas das polpas kraft, PRO e PROL. Apesar disso, alguns ensaios preliminares foram realizados para identificar a sua natureza química e caracterizar a presença de grupos funcionais importantes em sua estrutura.

As ligninas isoladas com dioxano:HCl foram inicialmente caracterizadas por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF). Nestes espectros (Figura 24), é clara a presença de fortes associações moleculares, que causaram um grande alargamento e a subsequente perda de resolução das bandas, dificultando a interpretação dos resultados. Várias estratégias de secagem deste material não permitiram a obtenção de um espectro de melhor qualidade, provavelmente devido à contaminação com sais oriundos do procedimento de acidólise.

FIGURA 24: ESPECTROS DE FTIR DAS LIGNINAS DIOXANO:HCl KRAFT, PR, PRO E PROL



A análise no IVTF das ligninas isoladas evidenciou a presença de grupos característicos de ligninas pelas absorções em 1714, 1618, 1514 cm^{-1} (MORAIS, 1992). Contaminações com carboidratos, particularmente, nas ligninas das polpas kraft e PRO, foram nitidamente observadas através da ocorrência do seguinte conjunto de bandas: em 1050 e 1120 cm^{-1} , atribuídas à deformações axiais de C-O em hidroxilas primárias e secundárias; em 1150 cm^{-1} , características de deformações axiais de C-O-C em ligações acetálicas; e na região de 1360 cm^{-1} , que caracterizam deformações angulares de OH no plano. Além disso, estas ligninas podem conter contaminação considerável com outras substâncias, como extraíveis residuais ou componentes hidroxilados de outra natureza, conforme sugerem a complexidade de suas respectivas impressões digitais no infravermelho médio.

É interessante observar que a presença de compostos carbonilados foi aparentemente maior na lignina PRO, quando comparada à lignina PROL, e que este

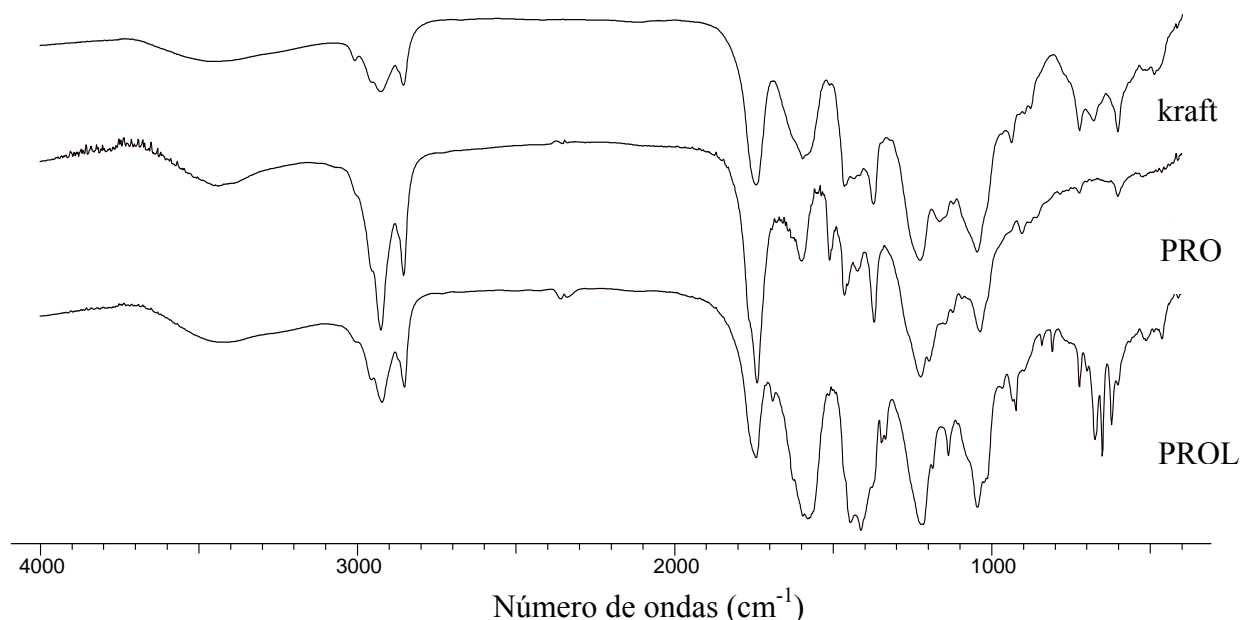
tipo de grupo funcional apresentou-se praticamente ausente no espectro da lignina kraft. Tal observação sugere que o tratamento com oxigênio molecular realmente oxida a lignina em vários de seus grupamentos funcionais, gerando grupamentos carbonílicos aparentemente não conjugados cujas bandas geralmente ocorrem em regiões acima de 1700 cm^{-1} . No entanto, o emprego de lacases-sistema mediador no processo de reciclagem altera a distribuição destes compostos carbonílicos, cujas bandas de deformação axial C=O encontram-se deslocadas para a região de 1600 e 1700 cm^{-1} . Este comportamento sugere a predominância de compostos carbonílicos conjugados, cuja formação está intimamente relacionada ao mecanismo de ação destas fenol-oxidases (lacases).

Para tentar deprender maiores resultados da análise por FTIR, as ligninas residuais das polpas kraft, PRO e PROL foram acetiladas com anidrido acético em piridina, resultando em ligninas modificadas que foram também submetidas à análise por cromatografia de permeação em gel.

O espectro da lignina acetilada da polpa kraft (Figura 25) foi caracterizado pela presença de bandas de deformação axial de O-H de álcoois em 3554 cm^{-1} , deformação axial de C-O de álcoois secundários alifáticos em 1121 cm^{-1} e deformação axial de C-O em ϕ -CHOH- em 1045 cm^{-1} (C_{α} da estrutura da lignina). A estrutura aromática é evidenciada pela banda de deformação axial de =C-H em 3013 cm^{-1} , vibração de esqueleto de anel guaiacílico em 1641 e 1592 cm^{-1} e vibração de esqueleto aromático combinado à deformação de C-H no plano em 1435 cm^{-1} . A banda de deformação axial de C=O não conjugada se encontra em 1739 cm^{-1} e esta deve estar associada à reação de acetilação de hidroxilas alifáticas, pois não estava presente no espectro da

polpa original. A predominância de estruturas guaiacílicas na lignina foi evidenciada pela banda de 1224 cm^{-1} , que corresponde à deformações de estruturas condensadas em ligninas de coníferas. Por outro lado, a ocorrência de uma banda em 1340 cm^{-1} sugere a presença de deformações axiais de C-O e/ou de C-H em anéis siringílicos, o que pode ser parcialmente confirmado pelas bandas de deformações angulares de C-H em 825 cm^{-1} , que se encontram muito pouco intensas (PERISSOTTO, 1999).

FIGURA 25: ESPECTROS NO IVTF DAS LIGNINAS ACETILADAS, KRAFT, PRO E PROL



Poucas diferenças são observadas comparando-se os espectros das ligninas acetiladas da polpa kraft e PRO, residindo apenas na melhor definição de algumas bandas. Foi possível observar, para o espectro da lignina acetilada da polpa PRO, a presença de bandas de deformação axial de C=O em 1764 e 1742 cm^{-1} , atribuídas à ésteres aromáticos e alifáticos, vibração de esqueleto de anel em 1605 e 1507 cm^{-1} e deformações de unidades guaiacílicas combinadas a C=O em 1271 cm^{-1} . Álcoois

primários também foram identificados devido à presença de banda de deformação axial de C-O em 1036 cm^{-1} , provavelmente associado à algum material não reagido, e a presença da banda decorrente de estruturas guaiacílicas condensadas foi confirmada em 1222 cm^{-1} .

O espectro da lignina acetilada da polpa PROL mostra diferenças marcantes em comparação com as ligninas anteriores. Percebem-se melhor estas diferenças nas bandas da região de $1400\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. As bandas em 1764 e 1745 cm^{-1} são atribuídas a ésteres, como anteriormente, mas nota-se a presença de uma banda em 1692 cm^{-1} , decorrente da deformação axial de $(\text{C}=\text{O})\text{-O-C}=\text{C}$ (ésteres conjugados). Vibrações de esqueleto de anel aromático combinado à $\text{C}=\text{O}$ conjugados são observadas pelas bandas em 1606 , 1580 e 1511 cm^{-1} , bem como através da banda de deformação de C-H fora do plano em 920 cm^{-1} . Álcoois são evidenciados na estrutura pela presença das bandas de deformação axial de C-O de álcool secundário alifático em 1134 cm^{-1} , de C-O de álcool aromático ($\varphi\text{-CHOH-}$) em 1043 cm^{-1} e de C-O de álcool primário em 1011 cm^{-1} .

A banda de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ não conjugada (1739 cm^{-1}) permite uma comparação interessante entre as ligninas acetiladas. Esta banda, que é parcialmente associada à reação de acetilação de hidroxilas alifáticas da lignina, aumenta da lignina kraft para a lignina PRO e diminui da lignina PRO para a lignina PROL. Embora os dados de FTIR não tenham objetivos quantitativos, é interessante observar que o tratamento oxidativo mudou a razão molar entre os grupos funcionais oxigenados da lignina e que, sendo este o caso, diferenças marcantes são esperadas para os

experimentos em que os teores de carbonilas, grupamentos ácidos e de hidroxilas fenólicas e alifáticas foram determinados (Tabela 7).

TABELA 7: PORCENTAGEM (m/m) DOS GRUPAMENTOS FUNCIONAIS DAS LIGNINAS ISOLADAS

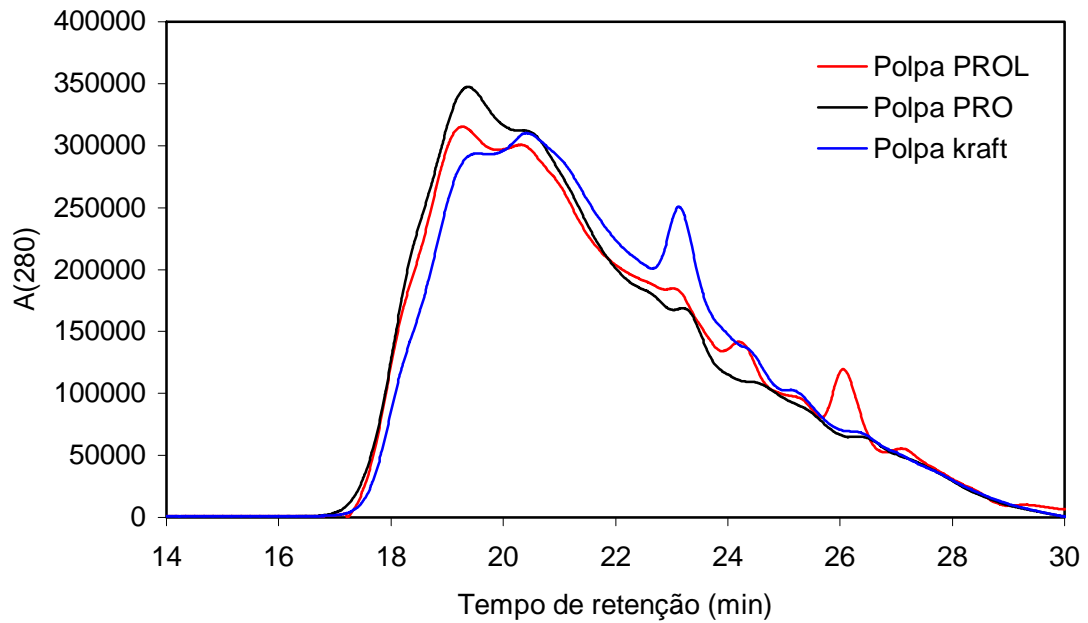
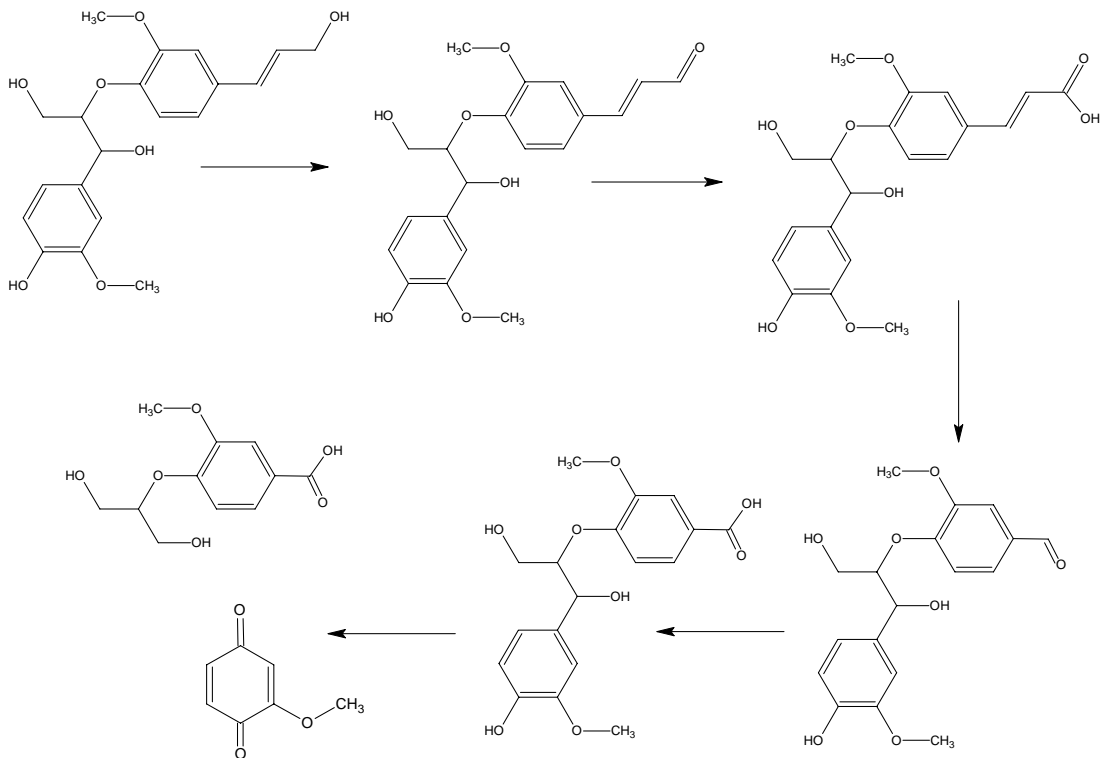
Amostra	OH _{phe} ^b	OH _{ali} ^b	Grupos ácidos ^b	Carbonilas ^b
Polpa kraft	0,305 ± 0,011	0,825 ± 0,014	0,090 ± 0,013	0,220 ± 0,058
PRO	0,490 ± 0,099	0,526 ± 0,164	0,250 ± 0,004	0,930 ± 0,179
PROL	0,315 ± 0,056	0,623 ± 0,033	0,720 ± 0,014	1,790 ± 0,180

^b medidas em duplicata

GUERRA, MENDONÇA E FERRAZ (2003) demonstraram que a lignina isolada do tratamento de *Pinus taeda* com *Ceriporiopsis subsvermispora* sofreu uma despolimerização significativa nos estágios iniciais de biodegradação (ou seja, em períodos inferiores a 30 dias). O tratamento da madeira com *C. subsvermispora* reduziu a média da massa molar aparente da lignina de 7790 Da para 6330 e 5300 Da após 15 e 30 dias de biodegradação, respectivamente. Contudo, este decréscimo não se acentuou com a prolongação do tempo de incubação. Esta diminuição na massa molar aparente da lignina foi atribuída à clivagem de ligações β-aril éter, realizadas pelas enzimas lacases e peroxidases excretadas pelo fungo.

As análises de CPG das ligninas (Figura 26) foram realizadas com amostras previamente acetiladas para permitir a solubilização no solvente de análise. Observou-se que a reciclagem convencional da polpa kraft (polpa PR) acarreta um aumento aparente na massa molar da lignina, sem motivar qualquer oligomerização devida, principalmente, à quebra de ligações aril-éter (Figura 27).

FIGURA 26: PERFIL DE ELUIÇÃO DE CPG DAS LIGNINAS ACETILADAS

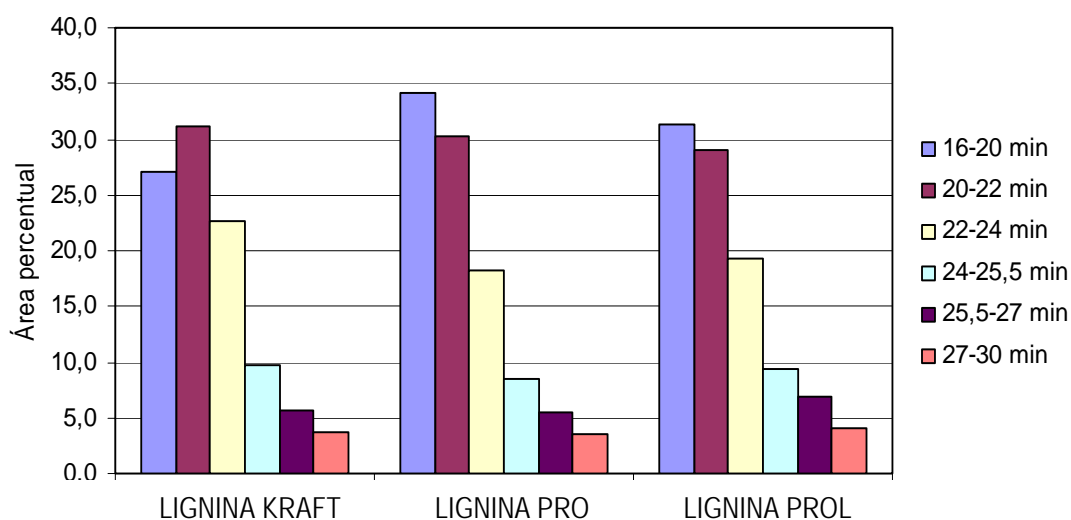
FIGURA 27: OXIDAÇÃO DAS FUNÇÕES PRESENTES NA LIGNINA COM A SUBSEQÜENTE CLIVAGEM DE LIGAÇÕES β -ARIL-ÉTER (FENGEL E WEGENER, 1989)

Os resultados apresentados na Figura 26 podem estar associados ao efeito da hornificação das fibras sobre o comportamento macromolecular da lignina que, por eventuais reações de condensação, ou por mera intensificação de forças intermoleculares de associação, sofreu um deslocamento da banda de eluição para volumes de retenção inferiores. O tratamento enzimático da polpa kraft reciclada reduziu este efeito sobre a estrutura da lignina, gerando, inclusive, a formação de fragmentos de menor massa molar, como o detectado no tempo de retenção de 26 min na Figura 26. Em relação ao controle, houve também uma diminuição da intensidade correspondente a massas molares intermediárias, sendo que o perfil de eluição sugere a formação de agregados cuja diferença em massa molar é relativamente constante. Este fato pode ser melhor visualizado no gráfico da Figura 28, onde a fração de 22 a 24 minutos, de massa molar intermediária, sofreu uma redução de 19,40 % para a polpa PRO e de 14,63 % para a polpa PROL. Outra fração de destaque corresponde a um tempo de eluição de 25,5 a 27 minutos, de massas molares inferiores, onde foi observado um aumento de 8,42 % para a polpa PRO e de 36,2 % para a polpa PROL.

Uma série de estudos de degradação (Figura 29) de compostos modelos de lignina, particularmente representados por dilignóis de estrutura β -O-4, com o emprego de enzimas de *Fusarium solani*, demonstraram que estruturas guaiacilglicerol- β -coniferil éter (1) são oxidadas a éter coniferaldeído (2) e ferulato (3), sendo que a cadeia lateral do ferulato é clivada entre o C $_{\alpha}$ e C $_{\beta}$ produzindo um éter da vanilina (4) que, por sua vez, é oxidado a um éter do ácido vanílico (5). A rota de degradação continua com a quebra da cadeia alquil-fenil com a produção de ácido

vanílico-2-glicerol éter (6), que é subsequente convertido em ácido vanílico (8). O fungo *Phanerochaete chrysosporium* degrada compostos fenólicos e não fenólicos que contenham ligações do tipo β -O-4. O modelo guaiacilglicerol- β -coniferil éter é convertido em guaiacilglicerol- β -guaiacilglicerol éter (2'), possivelmente, através de um epóxido α' - β' que é então convertido em ácido vanílico éter (Figura 25) (HIGUCHI, 2005).

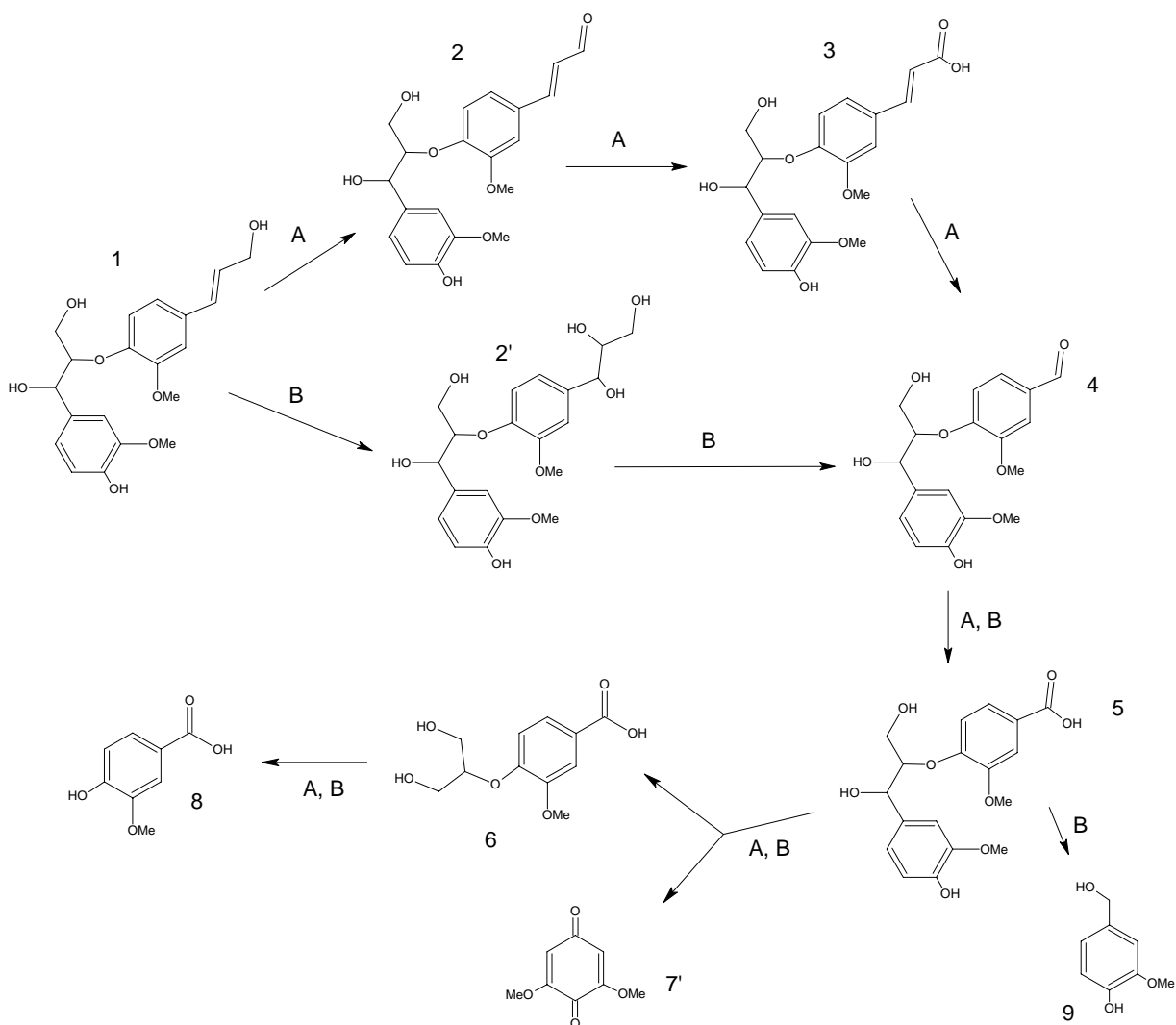
FIGURA 28: ÁREAS DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES A PARTIR DO PERFIL DE ELUIÇÃO DE CPG DAS LIGNINAS ACETILADAS



A análise dos principais grupos funcionais (Tabela 7) revela claramente os efeitos causados pelo tratamento oxidativo sobre a estrutura da lignina. O aumento no teor de hidroxilas alifáticas pode ser atribuído à clivagem oxidativa de grupos funcionais encontradas em sua estrutura. Observa-se também, que os teores de grupamentos ácidos e carbonilas aumentaram de forma marcante, justificando a

atuação oxidante do tratamento sobre álcoois alifáticos e estruturas fenólicas presentes inicialmente na estrutura (Figura 30).

FIGURA 29: VIAS DE DEGRADAÇÃO DE GUAIACILGLICEROL- β -CONIFERIL ÉTER POR *Fusarium solani* (A) E *Phanerochaete chrysosporium* (B) (HIGUCHI, 1985)



ELEGIR *et al.* (2005) demonstraram que o tratamento de compostos fenólicos modelos de lignina com lacases provenientes de *C. subvermispora* e *T. hirsuta* não apresentaram diferenças entre os seus respectivos modos de ação oxidativa. O

composto modelo empregado, 5-5'-di-hidro-creosol, sofreu oxidação na metila da posição 1 (Figura 31) levando à adição de uma hidroxila, e a oxidação deste composto levou à formação de um grupamento aldeídico. Estas alterações na lignina influenciaram diretamente o grau de associação das fibras da polpa, através da geração de cargas, e, conseqüentemente, afetaram as suas propriedades físico-mecânicas.

FIGURA 30: MECANISMO DE ATUAÇÃO DO SISTEMA LACASES-MEDIADOR (HBT) SOBRE A LIGNINA, ONDE >N-OH CORRESPONDE A UMA PORÇÃO DA ESTRUTURA DO MEDIADOR (BARRECA *et al*, 2003)

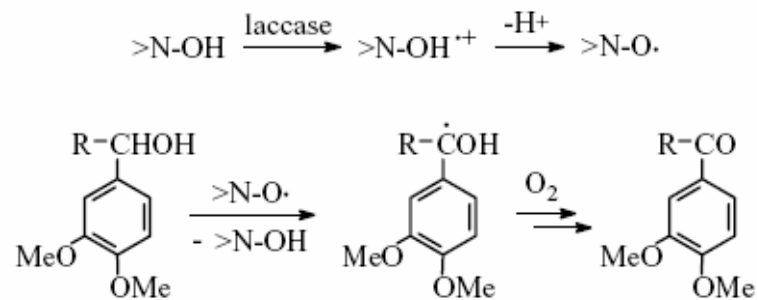
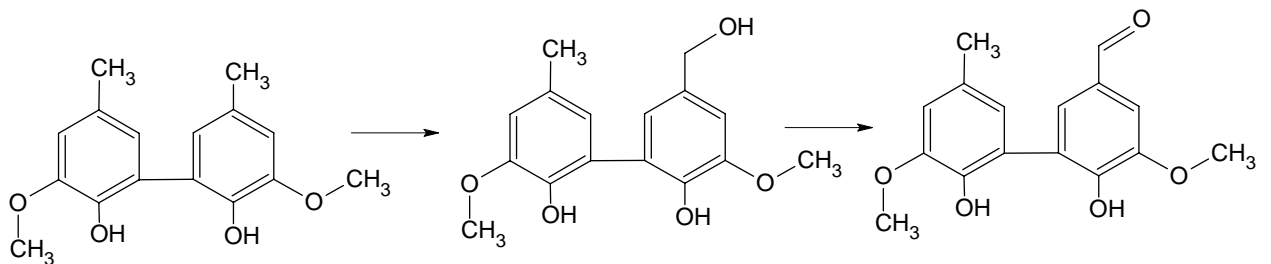


FIGURA 31: OXIDAÇÃO DE COMPOSTO MODELO PELA LACASE SISTEMA MEDIADOR (ELEGIR *et al*, 2005)



5. CONCLUSÕES

O emprego de lacases de *Trametes hirsuta* na reciclagem de polpas kraft não branqueadas, quando na presença do mediador hidroxibenzotriazol (HBT), promove alterações na composição química das fibras que contribuem para uma melhora em suas propriedades físico-mecânicas. Neste trabalho, a interpretação das alterações químicas, promovidas pelo tratamento com lacases-sistema mediador em relação ao controle, conduziu às seguintes conclusões experimentais:

- a mera hornificação das fibras celulósicas acarreta, por si só, efeitos importantes sobre os componentes macromoleculares da polpa kraft;
- o emprego de lacases no tratamento oxidativo das fibras reverte parte do efeito causado pela hornificação;
- os extrativos mais polares representam a classe de componentes da polpa que sofrem maior influência do tratamento enzimático oxidativo;
- o emprego de lacases não acarreta efeito significativo sobre os carboidratos da polpa, incluindo os ácidos hexenurônicos, cuja presença é determinante para a definição da susceptibilidade da polpa à foto-oxidação (ou amarelecimento);
- a lignina kraft presente na polpa tratada com lacases-sistema mediador sofre um decréscimo de sua massa molar aparente, caracterizada pelo acúmulo de oligômeros de massa molar ainda não determinada;
- o aumento de grupos funcionais polares na estrutura da lignina sugere que a polpa poderá apresentar melhor associação interfibrilar e, portanto, produzirá um papel reciclado de melhor qualidade.

Como as vantagens do emprego do sistema lacases-mediador na reciclagem de polpas kraft já foram demonstradas em estudo paralelo ao desenvolvimento deste trabalho, fica evidenciado o potencial que enzimas oxidativas podem ter na maximização da taxa de reciclagem de papéis marrons, principalmente aqueles empregados nas indústrias de embalagens.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÅKERHOLM, M.; HINTERSTOISSER, B; SALMÉN, L. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v 339, 2004, p. 569–578.

BARRECA, A.M.; FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P.; LJUNGGREN, S. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p.105-110, 2003.

BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v 46, 2000, p. 189-204.

BNDES. O Setor de Papel e Celulose no Brasil e no Mundo-1995. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/relato/rel52b.pdf>> Acesso em: 24 de setembro de 2003.

BRACELPA - Associação Brasileira de celulose e Papel. Disponível em:<<http://www.bracelpa.org.br>> Acesso em: 20 de agosto de 2005.

CALL, H.P.; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic system, especially laccase-mediator-system. **Journal of Biotechnology**, v. 53, 1997.

CHAKAR, F. S.; RAGAUSKAS, A. J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. **Industrial Crops and Products**, v 20 (2), 2004, p. 131-141.

CHEN, Z. X.; HEITMANN, J. A.; CHANG, H. M. "Secondary Fibre Quality Enhancement. Alkaline and Oxygen Treatment". **Paper Technology**. November, 1998.

CLEVELAND, F. C. Pulping of Secondary Fiber. In: Spangenberg, R. J. **Secondary Fiber Recycling**, Atlanta: TAPPI Press, 1993.

D' ALMEIDA; **Celulose e Papel**, v.1; INSTITUTO DE PESQUISA TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, São Paulo: Escola SENAI 2ª ed. 1988.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y.; **Methods in Lignin Chemistry**. New York: Springer Verlag, 1992.

DENCE, C.W.; REEVE, D.W., **Pulping Bleaching: Principles and Practice**. Atlanta: Tappi. 1996.

DONALDSON, L.A. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, 2001.

ELEGIR, G.DAINA, S.; ZOIA, L.; BESTETTI, G.;ORLANDI, M. Laccase mediator system: Oxidation of recalcitrant lignin model structures present in residual kraft lignin. **Enzyme and Microbial Technology**, v 37, 2005, p.340-346.

FENGEL, D.; WEGENER, G., **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FREELAND, S. A.; HRUTFIORD, B. Caustic Treatment of OCC For Strength Improvement During Recycling. **Tappi Journal**, v. 77(4), 1994.

GOMIDE, J.L.; DEMUNER, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. **O Papel**, v. 47, 1986.

GRÖNQVIST, S.; BUCHERT, J.; RANTANEN, K.; VIKARI, L.; SUURNÄKKI, A. Activity of laccase on unbleached and bleached thermomechanical pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32 , p.439–445, 2003.

HIGUCHI, T. Degradative Pathways of Lignin Model Compounds. *In*: HIGUCHI, T. **Biosynthesis and biodegradation of Wood Components**. London: Academic Press Inc, 1985, p.557-577.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v 33, 2003, p. 12-18.

GUERRA, A. A. **Biodegradação de Madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*: Caracterização dos Polímeros Residuais**. Tese de Doutorado, USP, 2002

GURNAGUL, N. "Sodium Hydroxide Addition During Recycling: Effects on Fiber Swelling and Sheet Strength". **Tappi Journal** , v.78,1995.

HILLIS, W. G.; **Wood Extractives and Their Significance to the Pulp and Paper Industries**. New York: Academia Press, 1962.

HINTERSTOISSER, B.; SALMÉN, L. Application of dynamic 2D FTIR to cellulose. **Vibrational Spectroscopy**, v 22, 2002, p.111-118.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo: Sarvier, 1995.

MINOR, J.L.; ATALLA, R. H.; HARTEN, T. M. "Improving interfibre bonding of recycled fibres". **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 19, J152, 1993.

MOCCHIUTTI, P.; ZANUTTINI, M. A.; SAPARRAT, M. C. N. Melhoria das propriedades de polpa não branqueada reciclada mediante sistema lacase/mediador. **O Papel**, ano LXVI, n.2, 2005, p.54-58.

MOLDENIUS, S. "The effects of peroxide bleaching on the strength and surface properties of mechanical pulping". **Journal of Pulp and Paper Science** , v. 10, J172,1984.

MORAIS, S. A. L. **Contribuição Ao Estudo Químico e Espectroscópico da Lignina de Madeira Moída do Eucalyptus grandis: Isolamento, Quantificação e Análise Estrutural**; Tese de Doutorado; UFMG; Belo Horizonte, 1992.

NAZHAD, N.; PASZNER, L. "Fundamentals of strength loss in recycled paper". **Tappi Journal**, v. 77, 1994.

PERISSOTTO, D. **Estudo da Composição Química do Extrato em Dioxano:HCl da Polpa Kraft de Eucalyptus grandis após Reações de Branqueamento**; Tese de Mestrado; UFV; Viçosa, 1999.

RAMOS, L. P., **Determination of cellulose degree of polymerization using gel permeation chromatography and universal calibration**. In: 7TH Brazilian Symposium

on the Chemistry of Lignins and other Components. Belo Horizonte, 2001. *Anais...* p. 17-24.

RÍO, J.C.; GUTIÉRREZ, A.; ROMERO, J.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T.; Identification of residual lignin markers in eucalypt kraft pulps by Py–GC:MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 58–59, p.425–439, 2001.

ROTHENBERG, S.; SHAW, J.; DURST, W. B. "Effect of chemical modification on the properties of lignin-containing fibres". **Paperi ja Puu** N°3:111, 1981.

SCHUERCH, C.; The Hemicelluloses *In*: Browning, B. L.; **The Chemistry of Wood**. New York: Interscience, 1963.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2nd Edition. San Diego: Academic Press Inc., 1992.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution. *In*: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.

SOUZA, M.L.; ANTES, R.; OLIVEIRA, R.S.; SOMMER, S.M. Avaliação da reciclabilidade de papéis Sack Kraft. **36º Congresso e Exposição Anual de Celulose e Papel**, São Paulo: ABTCP 2003.

TAPPI TEST METHODS. Atlanta: TAPPI Press, 1994.

WICKHOLM, K.; LARSSON, P.T.; IVERSEN, T. Assignment of non-crystalline forms in cellulose I by CP/MAS ¹³C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 312, 1998.

WONG, K.K.Y.; ANDERSON, K.B.; KIBBLEWHITE, R.P. Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps. **Enzyme and Microbial Technology** v. 25, p. 125–131, 1999.

ZAKIS, G. F. **Functional Analysis of Lignins and Their Derivatives**. Atlanta: TAPPI PRESS, 1994.

ZANDONÁ, A. **Caracterização de Celulases Derivadas de Cepas Recombinantes de *Trichoderma reesei* e Uso no Tratamento de Fibras Celulósicas Comerciais.** Tese de doutorado, UFPR, Curitiba, 2001.

ZANUTTINI, M. Y.; RUDI, M. “Optimización del blanqueo con peróxido a alta consistencia de pulpas quimimecánicas de álamo para papel de diarios”. **Revista ATIPCA**,v. 33, 1997.