

# BIOREFINAÇÃO – USO DE ENZIMAS NO MELHORAMENTO DA REFINAÇÃO DE UMA PASTA KRAFT BRANQUEADA DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*

Nuno Gil<sup>1</sup>, Cristina Gil<sup>1,2</sup>, Maria Emília Amaral<sup>1,2</sup>, Ana Paula Costa<sup>1,2</sup> e Ana Paula Duarte<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Investigação de Materiais Têxteis e Papeleiros, <sup>2</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel, Universidade da Beira Interior, 6200-001 Covilhã.

E-mail de contacto: apduarte@ubi.pt

## SUMÁRIO

Dois tipos de misturas comerciais de enzimas, a Celluclast (mistura de celulasas) e a Viscozyme L (mistura de beta-glucanase), foram usadas com diferentes dosagens e tempos de reacção, para melhorar a refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. O tratamento enzimático aumenta cerca de 80% o grau Schopper-Riegler (°SR) para o mesmo nível de energia de refinação (1500 revoluções PFI). De modo a avaliar a eventual degradação introduzida pelas enzimas foram determinadas as viscosidades das pastas antes e depois dos tratamentos enzimáticos. Os resultados estão concordantes com os obtidos para o comprimento das fibras, onde apenas ocorreu uma fraca diminuição desta propriedade. Este estudo foi complementado com a quantificação dos açúcares libertados nos filtrados dos tratamentos enzimáticos, antes e depois da refinação. As propriedades de resistência das pastas não foram significativamente afectadas com a aplicação das enzimas, tendo-se mesmo verificado uma melhoria na coesão interna.

**Palavras-chave:** Biorefinação; Enzimas; Pasta de *Eucalyptus globulus*; Hidrólise; Propriedades físicas

## SUMMARY

Two commercial enzymes mix Celluclast (cellulases mixture) and Viscozyme (beta-glucane mixture) were used to improve the refining process of an *Eucalyptus globulus* bleached kraft pulp. This treatment improved the Schopper-Riegler degree (°SR) by up 80% at the same level of refining energy (1500 PFI revolutions). The pulp degradation was evaluated by the pulp viscosity determination, which was in agreement with the fiber length determination that showed a slight diminution with the enzymatic treatment. The carbohydrate determination in the filtrates complemented this study. The strength properties of the pulp were not affected by this treatment, it was even observed an increase in internal cohesion.

**Key words:** Biorefining; Enzymes; *Eucalyptus globulus* Pulp; Hydrolysis; Physical properties

## INTRODUÇÃO

O uso de enzimas na indústria de pasta e papel sofreu um grande desenvolvimento nas duas últimas décadas. As enzimas celulolíticas têm sido intensivamente investigadas e usadas em várias aplicações, embora em muitas áreas ainda estejam em desenvolvimento. A reciclagem do papel é uma área onde a utilização de enzimas tem sido implementada, uma vez que as fibras recicladas podem ser melhoradas através de tratamentos com celulasas e hemicelulasas. De facto, estas enzimas modificam as propriedades inter faciais das fibras, aumentando a afinidade para a água, o que por sua vez provoca alterações nas propriedades técnicas da pasta e do papel, como a drenabilidade e a resistência do papel (Dienes *et al.* 2004; Oksanen *et al.* 2002; Pala *et al.* 2002). A destintagem de fibras secundárias tem sido outra utilização para estas enzimas (Pélach *et al.* 2003).

A influência destas enzimas nas fibras de espécies de madeira Portuguesas foi estudada pelo nosso grupo de trabalho (Spiridon e Duarte 2004; Spiridon *et al.* 2001a e b) e os resultados obtidos mostraram que celulasas e hemicelulasas comerciais influenciavam as propriedades papeleiras das pastas kraft cruas de *Eucalyptus globulus* e de *Pinus pinaster*. Este grupo de trabalho mostrou ainda que o tratamento das fibras de pastas kraft cruas de *Pinus pinaster* com xilanases comerciais dava origem a um aumento na sua flexibilidade com a consequente melhoria na capacidade de ligação inter fibras (Spiridon *et al.* 2003).

O uso de xilanases como activadores de branqueamento tem sido também uma aplicação biotecnológica na indústria de pasta e papel. O uso destas enzimas aumenta significativamente a branqueabilidade da pasta, uma vez que melhora a acessibilidade dos agentes químicos do branqueamento para as fibras (Roncero *et al.* 2005 e 2000; Shah *et al.* 2000).

O tratamento de fibras provenientes de diversas origens (pastas kraft cruas de resinosas, papel reciclado de cartão canelado) com diferentes celulasas e hemicelulasas comerciais resulta na redução do consumo energético durante a refinação. Esta economia é conseguida por redução do tempo de refinação para atingir os mesmos níveis de refinação, sem afectar as propriedades de resistência da pasta (Bhardwaj *et al.* 1996). Resultados semelhantes foram encontrados para a xilanase purificada obtida a partir do fungo *Trichoderma reesei* (Wong *et al.* 1999). Estes resultados são mais notórios quando os tratamentos são efectuados em pastas secas em vez de pastas nunca

secas (Garcia *et al.* 2002) e os melhores resultados foram encontrados com celulases purificadas em vez de misturas (Pere *et al.* 2000 e 1995).

O consumo de energia na indústria de pasta e papel é elevado, contribuindo em cerca de 18% do custo de produção. Para o desenvolvimento das propriedades pretendidas, uma pasta tem de ser sujeita ao processo de refinação, o qual representa 18% a 25% do total de energia eléctrica requerida para produzir papel (Bajpai *et al.* 2006; Bhardwaj *et al.* 1996). Devido à escassez em energia disponível e ao elevado custo energético, a conservação de energia tornou-se uma necessidade para a indústria papeleira. Consequentemente, qualquer tratamento à pasta que implique uma diminuição no consumo em energia, nomeadamente no que diz respeito à operação de refinação, terá um efeito benéfico no consumo global de energia na indústria. O uso de enzimas foi também testado numa escala industrial, mostrando que se reduziu o requisito energético em 25 kWh/ton de pasta (Bajpai *et al.* 2006).

Neste trabalho avaliou-se o resultado do tratamento de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* com duas misturas comerciais, uma de celulases e outra de beta-glucanase. O efeito destas enzimas na biorefinação foi avaliado para diferentes dosagens e tempos de reacção em termos de açúcares hidrolisados, propriedades de drenabilidade das pastas e das propriedades físicas das folhas de papel produzidas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Materiais.**

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* industrial, com uma viscosidade de 853 mL.g<sup>-1</sup>. Usaram-se enzimas comerciais (Novo Nordisk) designadamente a Celluclast 1.5 L, uma mistura de celulases, produzida a partir de uma estirpe seleccionada do fungo *Trichoderma reesei* e a Viscozyme L, mistura de enzimas degradativas dos hidratos de carbono (arabanase, celulase, beta-glucanase, hemicelulase e xilanase) com maior actividade enzimática para a beta-glucanase. A Viscozyme foi produzida a partir de uma estirpe seleccionada do fungo *Aspergillus aculeatus*.

### **Tratamento enzimático.**

A pasta foi tratada com 1, 2 e 4 UI de celulases (cel) e de beta-glucanase (bgluc) por grama de pasta. Este tratamento foi realizado em sacos de polietileno nas seguintes condições: 5% de consistência, temperatura de 50°C, tempo de reacção de 1 hora (agitação manual de 10 em 10 minutos). O pH da suspensão foi ajustado a pH= 5 para as celulases e a pH = 4,3 para a beta-glucanase, usando uma solução diluída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No caso da beta-glucanase foram ensaiados mais dois tempos de reacção (2 e 4 horas), e o tratamento foi efectuado em copos de precipitação, com agitação mecânica contínua. A reacção foi interrompida por lavagem com água desionizada até pH neutro. A pasta de controlo foi tratada em paralelo e de modo semelhante, sem adição de enzima.

### **Caracterização dos açúcares nos filtrados.**

Os filtrados dos tratamentos enzimáticos foram evaporados até resíduo seco, e este foi hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de modo a transformar os eventuais oligossacarídeos em açúcares redutores. A quantificação destes açúcares foi efectuada por determinação espectrofotométrica usando o ácido 3,5-dinitrossalicílico de acordo com o método referido por Miller (1959).

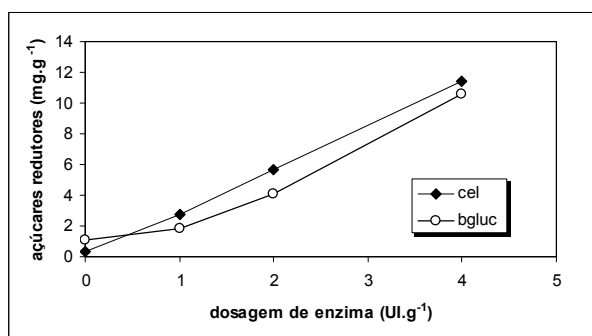
### **Caracterização da pasta.**

As propriedades morfológicas foram determinadas automaticamente por análise de imagem de uma suspensão diluída que passa numa câmara de fluxo, no equipamento MORFI®. A viscosidade das pastas foi determinada antes e depois do tratamento enzimático, de acordo com a norma ISO 5351/1. Todas as amostras de pasta foram refinadas no refinador PFI com uma consistência de 10% e uma intensidade de refinação de 3,33 N/mm. Posteriormente foram caracterizadas, determinando-se o grau Shopper-Riegler (°SR) de acordo com a norma ISO 5267/1 e o grau de retenção de água WRV (*water retention value*), de acordo com o método referido por Silvy e colaboradores (1968). As folhas laboratoriais foram preparadas de acordo com a norma ISO 5269/1. As propriedades mecânicas e estruturais das folhas foram medidas de acordo com as respectivas normas ISO.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

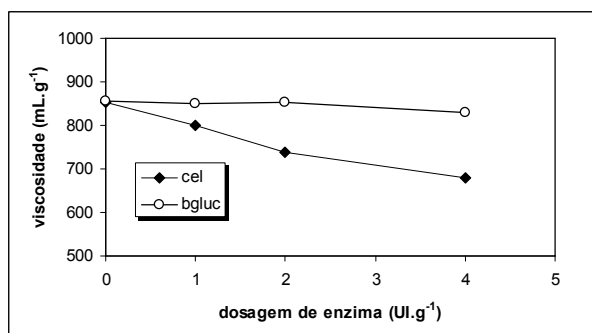
### **Acção das enzimas.**

A acção hidrolítica das enzimas sobre as fibras, foi verificada através da quantificação dos açúcares libertados no filtrado dos tratamentos enzimáticos. A figura 1 mostra os açúcares redutores totais libertados após os pré-tratamentos enzimáticos, indicando que a acção hidrolítica das celulases é superior à da beta-glucanase, e essa acção aumenta com a dosagem de enzima, como era de esperar.



**Figura 1 - Açúcares redutores totais libertados por grama de pasta para as diferentes dosagens de enzimas.**

Alguns autores consideram a hidrólise da pasta dentro de valores aceitáveis quando esta é menor que 3% (Pere *et al.* 2000). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que essa hidrólise não ultrapassou os 1,1% o que indica que este tratamento não degradou substancialmente a pasta. A acção hidrolítica sobre as pastas pode também ser estimada ao nível do grau de polimerização da celulose, aqui avaliada através da determinação da viscosidade da pasta (Figura 2).



**Figura 2 – Viscosidade das pastas em função das diferentes dosagens de enzimas.**

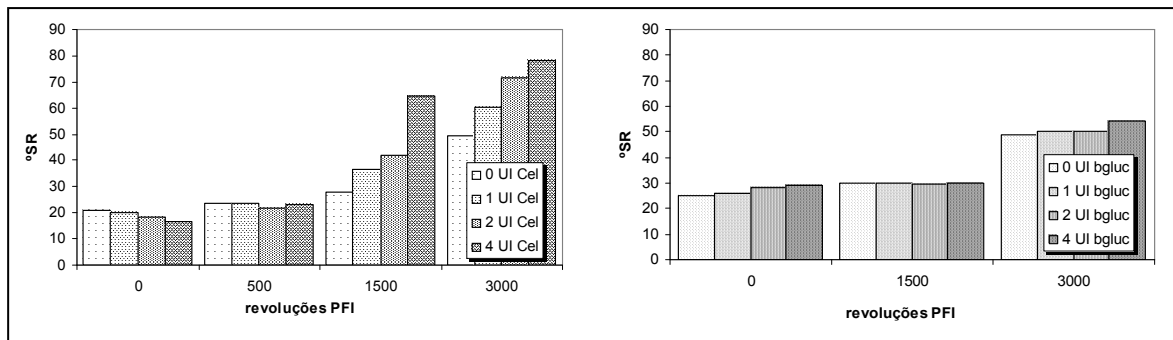
Esta figura mostra que a acção hidrolítica das celulasas é mais notória do que a da beta-glucanase, sendo que neste caso praticamente não se observa diminuição, estando concordante com os resultados obtidos para os açúcares. As características biométricas das fibras foram analisadas, a que melhor traduziu a degradação da fibra foi o comprimento, mostrando que, mesmo com a variável refinação, o efeito das diferentes dosagens de enzimas na degradação não foi significativa (Tabela 1). Esta acção das enzimas sobre as fibras irá ser preponderante nos efeitos observados nas propriedades, como veremos posteriormente.

**Tabela 1 – Efeito do tratamento enzimático e da refinação no comprimento médio ponderado em comprimento das fibras.**

Dosagem	Comprimento médio ponderado em comprimento (mm)							
	0 UI		1 UI		2 UI		4 UI	
	cel	bgluc	cel	bgluc	cel	bgluc	cel	bgluc
0 rev. PFI	0,811	0,801	0,809	0,803	0,806	0,804	0,804	0,803
1500 rev. PFI	0,796	0,796	0,773	0,794	0,730	0,794	0,667	0,787

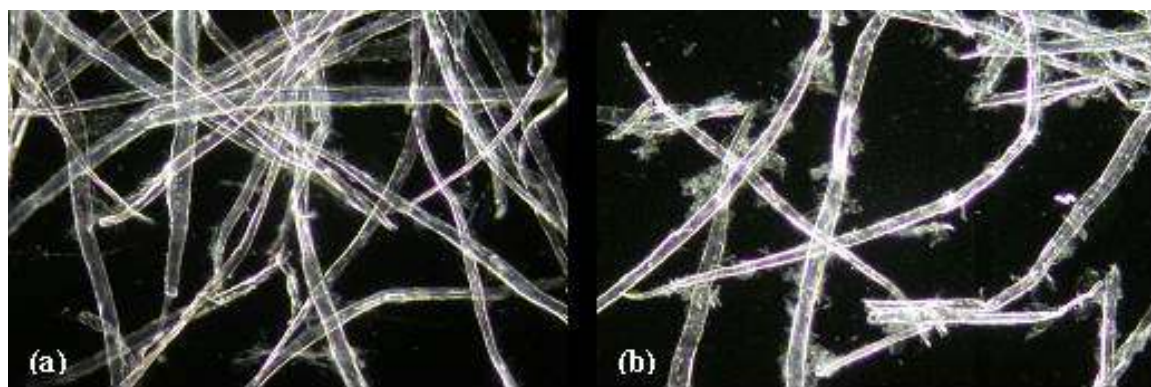
**Efeito do tratamento enzimático na refinação.**

O pré-tratamento enzimático, em especial com as celulasas, permite uma melhoria no comportamento da pasta no que respeita ao processo de refinação, em termos de índice de drenagem. Os gráficos da figura 3 mostram um aumento evidente do °SR para as pastas submetidas ao pré-tratamento com celulasas relativamente às não tratadas, este efeito é especialmente visível para as 1500 revoluções, onde se verifica um aumento de 80%.



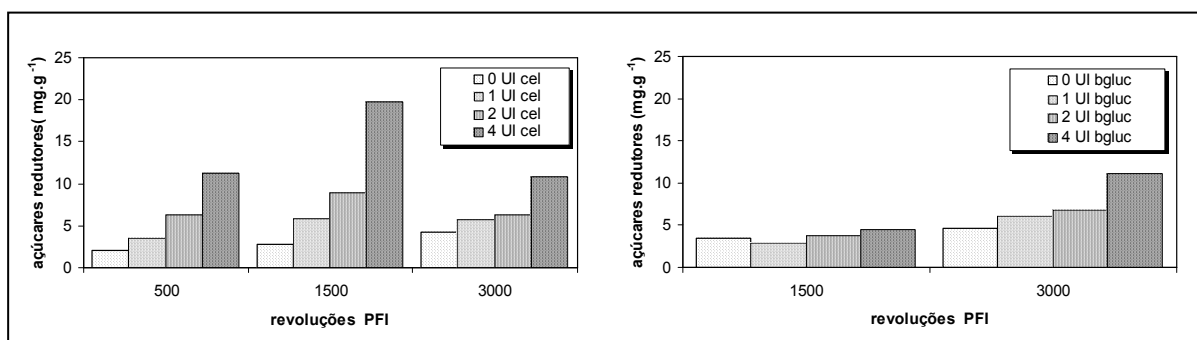
**Figura 3 - Evolução do grau Schopper-Riegler (°SR) com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.**

O efeito das enzimas para este grau de refinação pode ser explicado pelo aumento na fibrilação externa provocada pela acção das enzimas, o que é bem visível nas imagens obtidas por microscopia óptica de campo escuro, como se observa na figura 4.



**Figura 4 – Microfotografias para a pasta refinada a 1500 rev (a) sem tratamento enzimático, (b) com 4 UI de celulases.**

Esta modificação significativa no comportamento da pasta a 1500 revoluções PFI é também observada na libertação dos açúcares durante o processo de refinação e novamente para as celulases, como se pode ver na figura 5. No que respeita à beta-glucanase e para as mesmas revoluções PFI esse efeito não é tão visível, sendo mais evidenciado para as 3000 revoluções PFI. Os açúcares redutores foram determinados num filtrado recolhido após a refinação.



**Figura 5 – Evolução dos açúcares redutores totais libertados por grama de pasta com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.**

A hidratação da fibra durante a refinação, medida pelo WRV segue a tendência do grau Schopper-Riegler (Figura 6). Para o mesmo tempo de tratamento e nível de refinação, a adição de celulases à pasta mostra um aumento de 17% no WRV, ao passo que para a beta-glucanase o aumento é apenas de 6%. Este efeito mais

evidenciado aquando da adição de celulases, resulta provavelmente do facto destas enzimas degradarem mais a parede celular, dando origem a uma maior superfície exposta susceptível de estabelecer ligações com as moléculas de água e assim contribuir para uma maior hidratação.

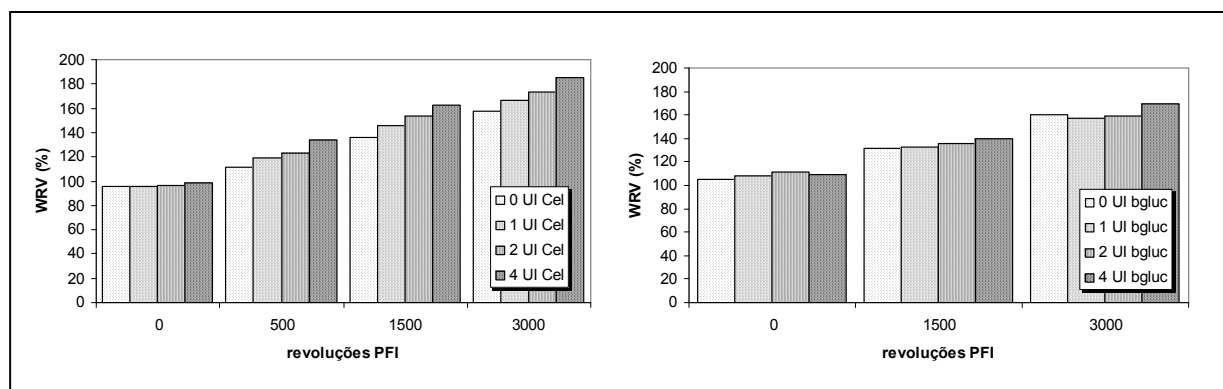


Figura 6 - Evolução do WRV com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

### Efeito do tratamento enzimático nas propriedades da pasta.

Como foi já referido, a acção das enzimas na degradação das hemiceluloses traduz-se numa maior ou menor degradação das fibras, a qual pode manifestar-se numa deterioração das propriedades físico-mecânicas das pastas. A resistência à tracção (Figura 7) para as pastas tratadas com celulases apresenta uma ligeira melhoria, sendo esta apenas contrariada com o incremento de concentração de enzima e de nível de refinação. No caso das pastas tratadas com beta-glucanase a tendência é semelhante, mas os efeitos são menos notórios.

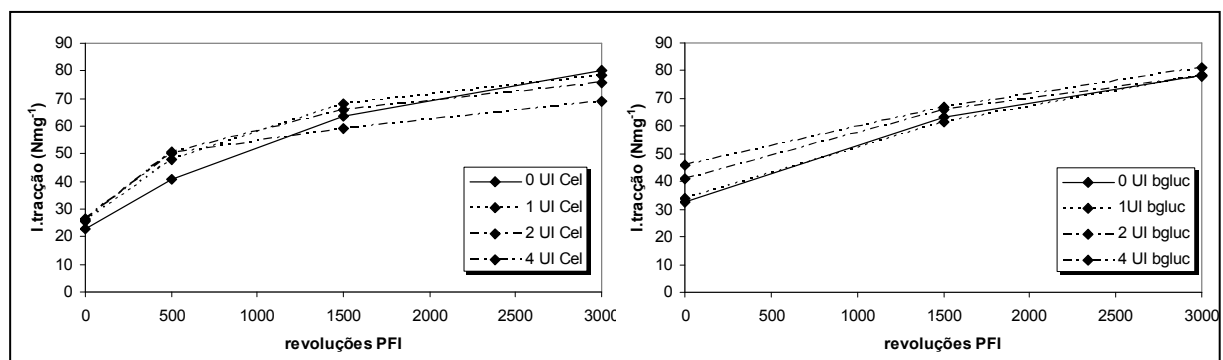


Figura 7 – Evolução da resistência à tracção com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

A figura 8 mostra a evolução da coesão interna, observando-se que esta propriedade foi significativamente incrementada pelo tratamento enzimático. Este facto pode ser explicado pelo aumento da fibrilação externa, já anteriormente referido e mostrado na figura 4.

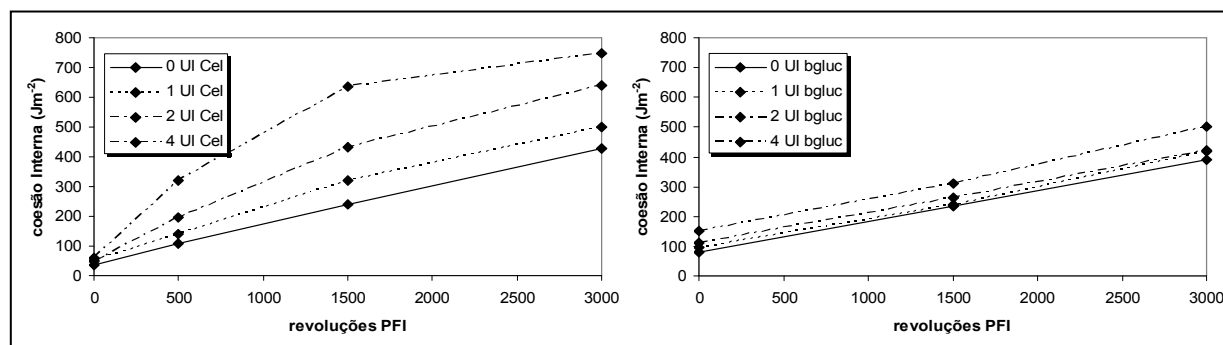


Figura 8 – Evolução da coesão interna com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

### Efeito do tempo de tratamento nas propriedades da pasta.

No caso da beta-glucanase, foi ainda estudado o efeito do tempo de tratamento, dado que uma hora de reacção não introduziu grandes alterações. A figura 9 mostra que apesar do efeito benéfico do tempo de reacção sobre o °SR, com um incremento de 57%, ocorreu no entanto uma diminuição de 34 % na resistência intrínseca da pasta.

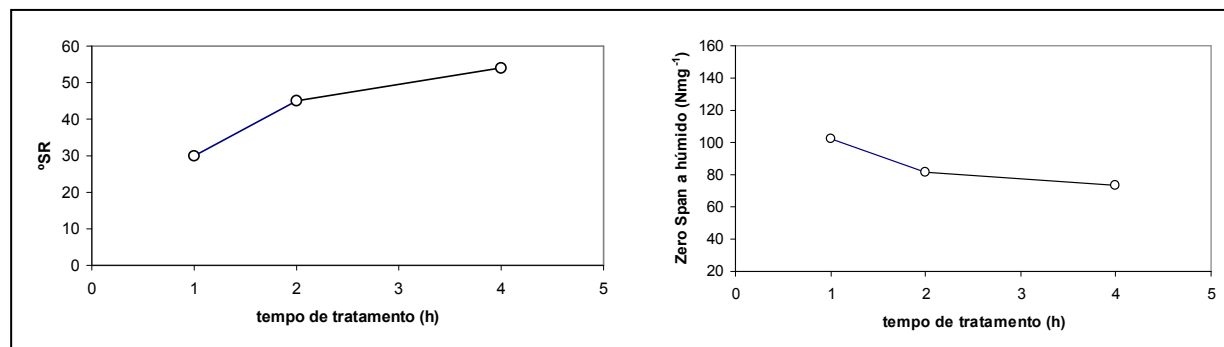


Figura 9 - Evolução do °SR e da resistência à tracção à distância zero (zero span) para a beta-glucanase com diferentes tempos de reacção.

### CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a biotecnologia pode contribuir de forma positiva para a indústria de pasta e papel. Este trabalho mostrou que a acção de um tratamento enzimático antes da refinação aumenta o índice de drenagem da pasta e o grau de hidratação das fibras, sendo este efeito mais visível no caso da adição das celulases. Este comportamento permite adiantar que para se atingir um determinado grau de refinação, a quantidade de energia a fornecer é menor. O efeito das enzimas ensaiadas sobre as propriedades da pasta, apesar de no caso das celulases se ter observado alguma degradação das fibras, não pode ser considerado nefasto para as propriedades de resistência da pasta, apresentando mesmo um aumento no caso da coesão interna. Para a beta-glucanase o melhor desempenho na refinabilidade surge para tempos de reacção elevados, no entanto a resistência intrínseca da fibra é ligeiramente afectada

### REFERÊNCIAS

- Bajpai, P., Mishra, S.P., Mishra, O. P., Kumar, S. and Bajpai, P.K. (2006). *Tappi Journal*. **5(11)**: 25-32.
- Bhardwaj, N.K., Bajpai, P., Bajpai, P.K. (1996). *Journal of Biotechnology*. **51**: 21-26.
- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K. (2004). *Industrial Crops and Products*. **20**: 11-21.
- García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Díaz, P., Vidal, T.(2002). *Cellulose*. **9**: 115-125.
- Miller, G. L. (1959). *Anal. Chemistry*. **31**: 426-431.
- Oksanen, T., Pere, J., Paavilainen, L., Buchert, J., Viikari, L.(2000). *Journal. of Biotechnology*. **78**: 39-48.
- Pala, H., Mota, M., Gama, F.M. (2002). *Biocatalysis and Biotransformation*. **20(5)**: 353-361.
- Pèlach, M.A., Pastor, F. J., Puig, J., Vilseca, F., Mutjé, P.(2003). *Process Biochemistry*. **38(7)**: 1063-1067.
- Pere, J., Siika-aho, M., Buchert, J., Viikari, L. (1995). *Tappi Journal*. **78(6)**: 71-78.
- Pere, J., Siika-aho, M., Viikari, L. (2000). *Tappi Journal*. **83(5)**: 1-8.
- Shah, A.K., Cooper, D., Adolphson, R., Eriksson, K.-E.L. (2000). *Journal of Pulp and Paper Science*, **26(1)**: 8-11.
- Silvy, J., Romatier, G., Chiodi, R.(1968). *Revue A.T.I.P.*. **22**: 31-53.
- Spiridon, I., Belgacem, M.N., Duarte, A.P. (2001a). *Cell. Chem. Technol.*, **35(3-4)**: 243-251.
- Spiridon, I., Duarte, A.P., Belgacem, M.N.(2001b). *Appita Journal*. **54(5)**: 457-459.
- Spiridon, I., Duarte, A.P., Curto, J. (2003). *Cell. Chem. Technology*. **37(5-6)**: 497-504.
- Spiridon, I., Duarte, A.P.(2004). *Cell. Chem. Technology*. **38(1-2)**: 59-65.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T. (2000). *Process Biochemistry*. **36**: 45-50.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T. (2005). *Bioresource Technology*. **96**: 21-30.
- Wong, K.K.Y., Kibblewhite, R.P., Signal, F.A. (1999). *J. Wood Chemistry and Technology*. **19(3)**, 205-212.