



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2008

Joana Andreia Saraiva Mendes **Estudo sobre a composição química e possíveis aplicações do folhelho de uva**



Joana Andreia Saraiva Mendes **Estudo sobre a composição química e possíveis aplicações do folhelho de uva**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis, realizada sob a orientação científica do Dr. Dmitry Victorovitch Evtugun, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Dra. Luísa Paula G. O. Valente da Cruz Lopes, Professora Adjunta do Departamento de Ambiente da Escola Superior de Tecnologia de Viseu do Instituto Superior Politécnico de Viseu.

Aos meus pais, os meus alicerces de vida

o júri

presidente

Prof. Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre

Professor associado com Agregação do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Bruno Miguel de Moraes Lemos Esteves

Assistente do II triénio do departamento de Madeiras da Escola Superior de Tecnologia de Viseu do Instituto Superior Politécnico de Viseu

Prof. Doutor Dmitry Victorovitch Evtyugin

Professor associado com Agregação do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Luísa Paula G. O. Valente da Cruz Lopes

Professora adjunta do departamento de Ambiente da Escola Superior de Tecnologia de Viseu do Instituto Superior Politécnico de Viseu

agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Dr. Dmitry Victorovitch Evtyugin e à Dra. Luísa Paula G. O. Valente da Cruz Lopes, pela orientação científica, pelo apoio e especialmente pelo incentivo demonstrado ao longo deste trabalho.

Ao Grupo Tavfer pelo apoio financeiro concedido.

À Sónia Prozil, pela amizade de já alguns anos, obrigada por tudo, até pela partilha de momentos menos bons, que no entanto nos fizeram crescer.

Ao Rui Domingues, pela preciosa ajuda nas análises de GC-MS, ao Rui Duarte, pela ajuda na medição dos ângulos de contacto, à Mariana, pela ajuda nos açúcares neutros.

À Ana Caço, por me ter deixado invadir o laboratório do 1º andar, pela boa disposição e pela amizade. À Vera, por ser incansável e pela profunda paciência para responder às minhas questões, tenho muito gosto em ser tua amiga. À Maria Jorge, pelas palavras amigas e pela elucidação de algumas dúvidas surgidas ao longo deste trabalho. Ao grupo Path, que me foi acolhendo na sua “sanzala”, pelos e-mails: “Hoje há bolo!” e pelos bolos. Às minhas “PHA’s”, a Liliana e a Mónica, à Andreia, à Vânia, à Marisa e à Vera que de uma maneira ou outra contribuíram para uma estadia agradável em Aveiro. Assim, a todos os meus novos amigos da Universidade de Aveiro que iluminaram os meus dias, aqui vos deixo um grande sinal de apreço.

Aos meus amigos e família que gostam de mim como sou e que me apoiaram e acreditaram em mim. Principalmente à matriarca da família, a minha avó Mabília e à minha irmã, por me ter dado uma jóia preciosa, o meu sobrinho Martim.

À família Machado, por todos os momentos. Pelo carinho, pelos conselhos.

Aos Coutinhos, por me acolherem e me fazerem sentir já parte da família, principalmente ao Sr. José Coutinho e à D. Maria de Lurdes. Um muito obrigado.

Ao Zé Carlos, pelo companheirismo e compreensão, por tornar os meus dias mais azuis, sem ti tudo isto teria sido mais difícil.

Por fim, quero deixar aqui um grande sinal de apreço aos meus pais, não existem palavras suficientes para vos expressar a minha gratidão. Amo-vos.

palavras-chave

Folhelho de uva, Cutina, Tratamento oxidativo organosolv, Caracterização Química

resumo

O principal objectivo deste trabalho consistiu no estudo da composição química do folhelho de modo a estimar as suas possíveis aplicações, nomeadamente, na produção de pastas e biocompósitos.

O folhelho foi caracterizado quanto ao seu teor em cinzas (7,8%), extractáveis em acetona (5,7%), diclorometano (5,5%) e água (26,4%), proteínas (18,8%), taninos (13,8%), resíduo insolúvel em ácido a 72 % (22,4%), celulose *Kürschner* e *Höffer* (20,8%) e hemiceluloses (24,9%).

Por análise de açúcares neutros verificou-se que é essencialmente constituído por celulose, mas também por mananas, arabinanas, xilanas e xiloglucanas. A existência de celulose foi confirmada pelas técnicas de análise dos açúcares neutros, FTIR, RMN de ^{13}C CP/MAS e DRX, com um grau de cristalinidade de 66,1%.

O tratamento do folhelho com ácido peracético, foi a solução encontrada para a obtenção de pastas. A pasta obtida foi caracterizada por análise de açúcares neutros, por FTIR e por RMN de ^{13}C CP/MAS, concluindo-se que é essencialmente constituída por celulose e por compostos poliméricos do tipo cutina.

A cutina, isolada pela extracção da pasta com diclorometano, é essencialmente polimérica. Pela identificação dos seus compostos livres e esterificados, foi apresentada uma hipotética estrutura, em que os seus monómeros poderão estar ligados por ligações éster entre grupos carboxilo de ácidos gordos, grupos hidroxilo de álcoois de cadeia longa e grupos hidroxilo de hidroxiácidos.

O baixo valor de viscosidade intrínseca da pasta, o reduzido comprimento médio das fibras (inferior a 0,2 mm) e o carácter hidrofóbico da sua superfície revelam que a pasta não poderá ser aplicada na indústria papelreira. No entanto, a presença de cutina permite antever a utilização do folhelho como matéria-prima para biocompósitos, podendo até poder ser aplicado em biomedicina.

keywords

Grape skin, Cutin, Organosolv oxidative treatment, Chemical characterization

abstract

The study of the grape skins chemical composition to estimate its possible applications, particularly in the production of pulps and biocomposites, was the main goal of this work.

Grape skins were characterized by its ashes percentage (7.8%), extractives in acetone (5.7%), dichloromethane (5.5%) and water (26.4%), proteins (18.8%), tannins (13.8%), 72% acid insoluble residue (22.4%), cellulose *Kürscher* and *Höffer* (20.8%) and hemicelluloses (24.9%). The use of neutral sugars analyses verified it's mainly constituted by cellulose, but also by mannans, arabinans, xylans and xyloglucans. The existence of cellulose was confirmed by the neutral sugar analyses, FTIR, ^{13}C NMR CP/MAS and X-ray diffraction techniques, with a crystallinity degree of 66.1%.

The treatment of grape skins with peracetic acid was the solution found to obtain pulps. The obtained pulp was characterized by neutral sugar analyses, FTIR ^{13}C NMR CP/MAS, which means that it's essentially constituted by cellulose and other cutin type polymeric compounds.

The cutin isolated by the extraction of pulp with dichloromethane is essentially polymeric. By the identification of free and esterified compounds hypothetical fragments was presented for the structure of the cutin, in which its monomers can be linked together by ester linkages between fat acids carboxyl groups, alcohol hydroxyl groups and hydroxyacids hydroxyl groups.

The low intrinsic viscosity value of the pulp, the fibers tiny average length (inferior to 0.2 μm) and the hydrophobic character of its surface show that the pulp can't be applied to the paper industry. The cutin presence yet allows the expected utilization of grape skins as raw material for biocomposites and even in biomedicine.

ABREVIATURAS

AA	Alcali activo
AP	Ácido peracético
c	Altura média de um cristalito
OCM	Organização comum do mercado
d_{002}	Largura a meia altura de cristalito no plano 002
DC	Grau de cristalinidade corrigido
DC0	Grau de cristalinidade
DO	Denominações de origem
DRX	Difracção de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento
E	Extractáveis
ED	Extractos em diclorometano da pasta sililados antes da metanólise
EDM	Extractos em diclorometano sililados da pasta após metanólise
E_{H_2O}	Extractáveis em água
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GPC	Cromatografia de permeação por gel
I_{am}	Intensidade máxima da região amorfa
I_c	Intensidade máxima do plano de difracção 002
IVV	Instituto da vinha e do vinho
L	Lenhina
LED	Pasta livre de extractáveis, após metanólise e sililação
M_n	Massa molecular média em número
M_w	Massa molecular média ponderada
OIV	Organização internacional da vinha e do vinho
P	Proteínas
θ	Ângulo de contacto

RMN ^{13}C de CP/MAS	Ressonância magnética nuclear de carbono-13, de polarização cruzada segundo o ângulo mágico
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
RMN ^1H - ^1H (TOCSY)	Ressonância magnética nuclear a 2D de correlação total
S	Índice de sulfureto
S/EA	Sem extractáveis em acetona
S/ED	Sem extractáveis em diclorometano
T	Taninos
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
TMS	Trimetilsililado
UE	União europeia
W	Humidade
Z	Cinzas

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. O SECTOR VITIVINÍCOLA	3
1.1. O SECTOR VITIVINÍCOLA EM PORTUGAL	3
2. UVAS, A MATÉRIA-PRIMA DO VINHO	5
2.1. ENGAÇO	5
2.2. BAGO	5
2.2.1. <i>Película</i>	6
2.2.2. <i>Polpa</i>	7
2.2.3. <i>Grainha</i>	7
2.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA UVA	7
2.3.1. <i>Polissacarídeos</i>	8
2.3.2. <i>Lenhina</i>	11
2.3.3. <i>Compostos alifáticos</i>	12
2.3.4. <i>Ácidos Orgânicos</i>	12
2.3.5. <i>Compostos fenólicos</i>	13
2.3.6. <i>Aromas</i>	15
2.3.7. <i>Substâncias Azotadas</i>	16
2.3.8. <i>Matérias Minerais</i>	16
2.4. PROCESSO DE VINIFICAÇÃO	17
2.4.1. <i>Vinificação em tinto</i>	17
2.4.2. <i>Vinificação em branco</i>	17
3. SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO	18
3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO	18
3.1.1. <i>Folhelho</i>	19
4. PROCESSOS QUÍMICOS DE PRODUÇÃO DE PASTAS CELULÓSICAS.....	20
4.1. COZIMENTO KRAFT	20
4.1.1. <i>Reacções da lenhina durante o cozimento kraft</i>	21
4.1.2. <i>Reacções dos hidratos de carbono durante o cozimento kraft</i>	22
4.2. TRATAMENTO COM PERÁCIDOS.....	22
4.2.1. <i>Reacções de Perácidos com Lenhina</i>	23
4.2.2. <i>Reacções de Perácidos com Polissacarídeos</i>	25
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
1. MATERIAIS	27

2. ANÁLISE QUÍMICA DO FOLHELHO DE UVA E DAS PASTAS	27
2.1. TEOR DE HUMIDADE	27
2.2. CINZAS	27
2.3. EXTRACTÁVEIS	28
2.4. EXTRACTÁVEIS EM ÁGUA	28
2.4.1. <i>Substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol</i>	28
2.5. CELULOSE KÜRSCHER E HÖFFER	29
2.6. PROTEÍNAS	29
2.7. TANINOS	29
2.8. LENHINA KLASON	30
2.9. AÇÚCARES NEUTROS	30
2.10. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CUTINA	31
2.10.1. <i>Extracção</i>	31
2.10.2. <i>Metanólise dos Extractos</i>	31
2.10.3. <i>Metanólise da Pasta livre de Extractáveis</i>	32
2.10.4. <i>Caracterização Estrutural</i>	32
2.11. ESPECTROSCOPIA DE ÍNFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR	32
2.12. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C CP/MAS	33
2.13. ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ¹ H	33
2.14. ESPECTROSCOPIA DE RMN ¹ H- ¹ H (TOCSY)	33
2.15. CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL – GPC	33
2.16. DIFRACÇÃO DE RAIOS-X	34
3. OBTENÇÃO DE PASTAS DE FOLHELHO DE UVA	35
3.1. COZIMENTO KRAFT	35
3.2. TRATAMENTO COM ÁCIDO PERACÉTICO	35
3.3. TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO E MOLIBDATO DE AMÓNIO	36
4. ANÁLISE DE PASTAS	36
4.1. VISCOSIDADE INTRÍNSECA	36
4.2. HISTOGRAMA DE FIBRAS	37
4.3. MEDIÇÃO DE ÂNGULOS DE CONTACTO	37
4.4. ANÁLISE TÉRMICA	37
4.4.1. <i>TGA</i>	38
4.4.2. <i>DSC</i>	38
CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1. ANÁLISE QUÍMICA DO FOLHELHO	39
1.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FOLHELHO	40
1.2. RESÍDUO INSOLÚVEL EM H ₂ SO ₄ A72 %	42
1.3. POLISSACARÍDEOS	43

1.3.1.	<i>Açúcares Neutros</i>	43
1.3.2.	<i>Celulose</i>	43
1.3.3.	<i>Hemiceluloses</i>	44
2.	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PASTAS	47
2.1.	COZIMENTO KRAFT	47
2.2.	TRATAMENTO COM ÁCIDO PERACÉTICO	48
2.3.	TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO E MOLIBDATO DE AMÓNIO.....	49
2.4.	ANÁLISE QUÍMICA DA PASTA.....	50
2.4.1.	<i>Caracterização Estrutural</i>	50
2.4.2.	<i>Açúcares Neutros</i>	51
2.4.3.	<i>Caracterização da cutina</i>	52
2.5.	VISCOSIDADE INTRÍNSECA	58
2.6.	HISTOGRAMA DE FIBRAS.....	59
2.7.	MEDIÇÃO DE ÂNGULOS DE CONTACTO	59
2.8.	ANÁLISE TÉRMICA DA PASTA E SEUS EXTRACTOS	60
2.8.1.	<i>TGA</i>	60
2.8.2.	<i>DSC</i>	61
	CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	63
1.	TRABALHO FUTURO	65
	CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura do cacho de uva [5].</i>	5
<i>Figura 2: Esquema de um bago [5].</i>	6
<i>Figura 3: Corte esquemático do bago [5].</i>	7
<i>Figura 4: Estrutura da cadeia da celulose.</i>	8
<i>Figura 5: Célula unitária da celulose I (a) projectada no plano a-c (b) [16].</i>	9
<i>Figura 6: Estrutura da unidade de repetição da cadeia de xiloglucana.</i>	10
<i>Figura 7: Estrutura da O-Acetil-4-O-Metilglucoronoxilana.</i>	10
<i>Figura 8: Estruturas dos álcoois precursores da lenhina: (a) p-cumarílico, (b) coniferílico e (c) sinapílico.</i>	12
<i>Figura 9: Ácido oleico.</i>	12
<i>Figura 10: Estrutura química de (a) ácido tartárico, (b) ácido málico e (c) ácido cítrico.</i>	12
<i>Figura 11: Estrutura química da quercetina.</i>	13
<i>Figura 12: Estrutura da antocianidina.</i>	13
<i>Figura 13: Ácidos fenólicos presentes nas uvas: (1) benzóicos e (2) cinâmicos [24].</i>	14
<i>Figura 14: Estrutura da procianidina (tanino condensado) [26].</i>	14
<i>Figura 15: Estruturas do (a) limoneno e do (b) ácido gerânico.</i>	16
<i>Figura 16: Clivagem de ligações β-O-4 em estruturas fenólicas eterificadas.</i>	21
<i>Figura 17: Mecanismo da reacção de stopping: formação do 1,2-enodiol (1), eliminação β-hidroxilo (2), tautomerização (3), rearranjo benzílico para ácido glucometassacarínico (4) [33].</i>	22
<i>Figura 18: Principais reacções da lenhina com perácidos: (a) hidroxilação do anel aromático, (b) desmetilação oxidativa, (c) abertura do anel aromático por oxidação e formação de derivados do ácido mucónico, (d) substituição de cadeia, (e) clivagem de ligações β-aril éter, (f) epoxidação.</i>	24
<i>Figura 19: Espectro de FTIR do folhelho.</i>	40
<i>Figura 20: Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C do folhelho.</i>	41
<i>Figura 21: Espectro de FTIR do resíduo insolúvel em H_2SO_4 a 72 %.</i>	42
<i>Figura 22: Espectros de RMN sólido do resíduo insolúvel em H_2SO_4 a 72 %.</i>	42
<i>Figura 23: Difractograma de Raios-X da celulose.</i>	44
<i>Figura 24: Curva de eluição das SSP.</i>	44
<i>Figura 25: Espectro de RMN de ^1H das SST.</i>	46
<i>Figura 26: Espectro de RMN de correlação ^1H-^1H (TOCSY) das SSP.</i>	46
<i>Figura 27: Resíduo resultante do cozimento kraft do folhelho.</i>	47
<i>Figura 28: Fases do tratamento AP: (a) início (b) após 1º estágio e (c) fim do tratamento.</i>	48
<i>Figura 29: Película de pasta.</i>	48
<i>Figura 30: Espectros de FTIR de (a) folhelho de uva e (b) pasta.</i>	50
<i>Figura 31: Espectros de RMN ^{13}C de CP/MAS (a) folhelho de uva e (b) pasta.</i>	51
<i>Figura 32: Curva de eluição dos extractáveis da pasta.</i>	52
<i>Figura 33: Cromatogramas totais dos extractos em diclorometano derivatizados, (a) antes e (b) após metanólise e (c) da pasta livre de extractos em diclorometano, após metanólise.</i>	53

Figura 34: Principais famílias de compostos existentes nos extractos da pasta, (ED) antes e (EDM) após metanólise, e na (LED) pasta livre de extractáveis. _____	55
Figura 35: Espectros de massa dos derivados do ácido hexadecanóico: (a) TMS e (b) éster metilado. ____	56
Figura 36: Espectro de massa do derivado TMS do ácido 9,10 - hidroxioctadecanóico. _____	56
Figura 37: Espectro de massa do derivado TMS do 1-Hexacosanol. _____	57
Figura 38: Espectro de massa do derivado TMS do Ácido Oleanóico. _____	57
Figura 39: Fragmentos propostas para a estrutura da cutina. _____	58
Figura 40: Histograma de fibras. _____	59
Figura 41: Método da gota séssil para calcular o ângulo de contacto. _____	60
Figura 42: Curvas da TGA da pasta (a) e dos extractáveis da pasta (b). _____	60
Figura 43: Curvas de DSC da (a) pasta e dos (b) extractáveis da pasta. _____	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Inventário das Superfícies Vitícolas [4]. _____	4
Tabela 2: Estruturas base de terpenos. _____	15
Tabela 3: Composição dos subprodutos resultantes da produção de vinho [32]. _____	18
Tabela 4: Composição dos bagaços [31]. _____	19
Tabela 5: Composição do folhelho [31,32]. _____	19
Tabela 6: Termos utilizados no cozimento kraft. _____	20
Tabela 7: Componentes das tensões superficiais de cada líquido utilizado. _____	37
Tabela 8: Composição química do folhelho de uva. _____	39
Tabela 9: Frequências vibracionais e tipos de vibração. _____	40
Tabela 10: Sinais de RMN CP/MAS de ¹³ C. _____	41
Tabela 11: Composição média em monossacarídeos do folhelho de uva. _____	43
Tabela 12: M_w , M_n e a M_w/M_n das substâncias isoladas em água quente e precipitadas em etanol. _____	45
Tabela 13: Açúcares neutros existentes nas substâncias isoladas em água quente e precipitadas em etanol. _____	45
Tabela 14: Condições de análise do cozimento kraft. _____	47
Tabela 15: Condições de análise do tratamento com ácido peracético. _____	49
Tabela 16: Composição média em monossacarídeos da pasta relativamente ao folhelho de uva. _____	51
Tabela 17: Compostos lipofílicos identificados nos extractos (mg de composto/kg de pasta). _____	54
Tabela 18: Ângulo de contacto e componentes de energia de superfície entre uma gota líquida e as superfícies da pasta e do papel. _____	60

INTRODUÇÃO

O sector vitivinícola tem um elevado peso na economia portuguesa, sendo imprescindível atingir-se um desenvolvimento equilibrado e sustentado do sector.

Face às exigências da União Europeia, torna-se necessário introduzir requisitos ambientais mínimos para o sector, como novas soluções de valorização e de tratamento dos subprodutos. O desenvolvimento de tecnologias já existentes, assim como a criação de novas tecnologias de valorização dos recursos subaproveitados, representam uma mais-valia para as empresas do sector tanto a nível económico como ambiental.

O bagaço, as grainhas, o folhelho, o engaço, as borras e o sarro constituem os subprodutos da vinificação. O folhelho é essencialmente constituído pelas películas das uvas e foi o objecto de estudo ao longo deste trabalho

O objectivo deste trabalho consistiu no estudo da composição química do folhelho de modo a estimar as suas possíveis aplicações, nomeadamente, na produção de pastas.

No capítulo I, são apresentadas algumas considerações sobre o sector vitivinícola de modo a compreender-se a importância deste na economia e na necessidade de se encontrar soluções para um desenvolvimento sustentado. De seguida descreve-se a composição química da uva, os processos de vinificação que a transformam em vinho e são igualmente identificados e caracterizados os subprodutos resultantes. Ainda neste capítulo faz-se referência a processos químicos de produção de pastas celulósicas.

O material e os métodos utilizados na análise química do folhelho, na preparação e análise das pastas encontram-se descritos no capítulo II.

No capítulo III, são apresentados e discutidos os resultados obtidos no estudo da composição química do folhelho e na caracterização dos seus componentes pelas técnicas de FTIR, RMN ^{13}C de CP/MAS, RMN de ^1H , RMN ^1H - ^1H (TOCSY), DRX, e GPC. Foram analisados os processos de obtenção de pasta a partir de folhelho. O processo escolhido foi optimizado e a pasta obtida foi examinada quanto à sua viscosidade intrínseca, à dimensão das suas fibras e a sua superfície foi analisada quanto ao seu carácter hidrofóbico/hidrofílico. Foram também efectuadas análises térmicas, comparando a pasta com os extractáveis em diclorometano da mesma. Neste capítulo, foi ainda efectuada a caracterização estrutural da cutina, por GPC e por GC-MS.

Por fim, no capítulo IV, apresentam-se as conclusões finais deste trabalho e as perspectivas futuras.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. O SECTOR VITIVINÍCOLA

O sector vitivinícola é um dos sectores mais importantes da produção agrícola na União Europeia, representando uma actividade económica vital nomeadamente para o emprego. Embora a produção de vinho varie consideravelmente de um Estado-Membro para outro, seja em termos de dimensão dos vinhedos ou de práticas enológicas adaptadas a diferentes condições climáticas, este sector é parte integrante da cultura e do património.

A produção de vinho representou 5% do valor da produção agrícola da União Europeia (UE), em 2006, correspondendo a 22% da mão-de-obra agrícola. Tendo sido produzidos, em média, cerca de 185 milhões de hectolitros de vinho por ano, no valor de 15,6 mil milhões de euros, nos últimos cinco anos. Com as tendências actuais, o excedente de produção vinícola atingirá 15% da produção anual em 2010/11 e só com a eliminação dos excedentes, para os quais não há mercado, a UE gasta cerca de 500 milhões de euros por ano [1].

Como forma de colmatar as falhas da anterior Organização Comum do Mercado (OCM) vitivinícola, a União Europeia propôs uma reforma de modo a edificar uma OCM eficaz e sustentável. A “nova” OCM, que entrou em vigor em Agosto deste ano, de modo a assegurar medidas a nível ambiental, pretende introduzir requisitos ambientais mínimos para o sector vitivinícola, nomeadamente, ao nível da erosão e contaminação do solo, da utilização de produtos fitofarmacêuticos e da gestão dos resíduos [2].

1.1. O Sector Vitivinícola em Portugal

Em Portugal a produção de vinho é especialmente importante representando cerca de 10 % da produção agrícola, segundo dados de 2006 [2]. A plena utilização do património vitícola nacional, bem como a melhoria da qualidade dos vinhos portugueses, através da valorização das vinhas aptas à produção de vinhos de qualidade e o aumento da competitividade das explorações vitícolas e das empresas do sector estabelecem os objectivos centrais da política vitivinícola seguida pelo Governo Português [3].

A superfície vitícola nacional é de cerca de 239 mil hectares, segundo a campanha da Comissão Europeia de 01/09/2004 (Tabela 1), a que equivale uma produção de cerca de 7,2 milhões de hL de vinho, correspondente a 1 milhar de milhões de euros por ano [1,4].

Tabela 1: Inventário das Superfícies Vitícolas [4].

Região vitícola	Área (ha)
Minho	32 881
Douro e Trás-os-Montes	68 455
Beiras	56 910
Ribatejo	20 239
Estremadura	25 339
Terras do Sado	9 042
Alentejo	21 740
Algarve	2 098
Total	236 704

Devido à importância económica do sector vitivinícola em Portugal e de modo a alcançar um desenvolvimento equilibrado e sustentado do sector, fazendo face às exigências da reforma da Organização Comum de Mercado, torna-se cada vez mais importante encontrar novas e melhores técnicas de valorização e tratamento dos resíduos e/ou subprodutos vitivinícolas, tentando-se assim também solucionar o problema dos excedentes.

2. UVAS, A MATÉRIA-PRIMA DO VINHO

O vinho é elaborado a partir da fermentação alcoólica total ou parcial de uvas frescas, esmagadas ou não, ou de mosto de uva. As uvas são o fruto de planta herbácea – Videira, da família das Vitáceas, pertencente às angiospérmicas (folhosas), sendo que as apropriadas para vinificação pertencem à espécie *Vitis Vinífera*.

As uvas estão aglomeradas em cachos e cada cacho é constituído por duas partes distintas: o engaço, parte lenhosa, e os bagos, parte carnuda.

2.1. Engaço

O engaço representa 3 a 9% do peso do cacho e determina a sua estrutura (Figura 1). É composto por um eixo principal, designado por *ráquis* (ramificação mais comprida) que está ligado ao pedúnculo, e por ramificações mais curtas, pedicelos, que suportam os bagos e lhes fornecem água e sais minerais [5].

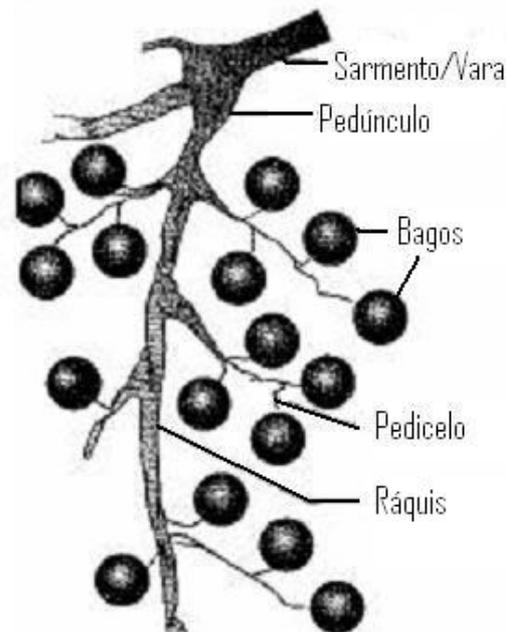


Figura 1: Estrutura do cacho de uva [5].

2.2. Bago

O bago de uva é constituído por um grupo de tecidos (pericarpo) que envolvem as sementes (grainhas) e representa 91 a 97 % do peso do cacho. O pericarpo divide-se em exocarpo (película), mesocarpo (polpa) e endocarpo (Figura 2) [6].

2.2.1. Película

A película, parte externa do bago, é uma membrana heterogénea e elástica que se distende à medida que o bago cresce e que se divide em: cutícula, epiderme e hipoderme [7].

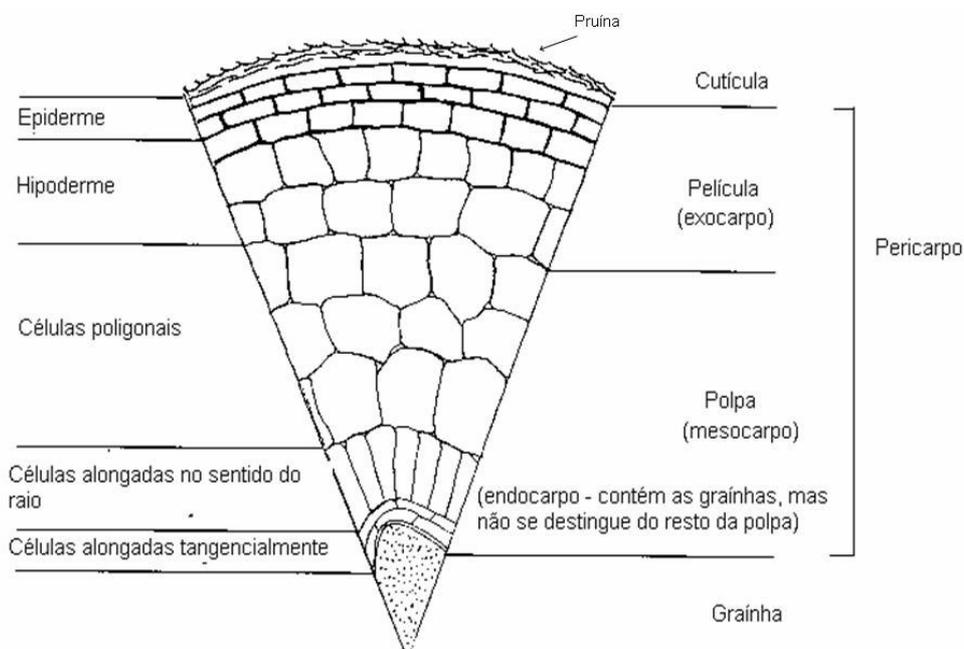


Figura 2: Esquema de um bago [5].

No decorrer da maturação e desenvolvimento da uva, a cutícula desorganiza-se e a sua espessura diminui. A cutícula é composta por ácidos gordos hidroxilados (cutina) e sobre esta encontra-se a pruína, que é uma substância cerosa, responsável pelo aspecto aveludado, impermeabilidade e resistência do bago, e pela retenção de leveduras e bactérias trazidas pelo vento e por insectos [6,8].

A pruína é relativamente constante ao longo da maturação da uva e está disposta em camadas hidrofóbicas, constituídas por: ácido oleanólico (maioritariamente) e compostos orgânicos, nomeadamente álcoois gordos [7].

A epiderme é constituída por uma ou duas camadas de células, tangencialmente alongadas, cuja espessura varia de acordo com a variedade da uva. A hipoderme está dividida em duas regiões: a região externa é composta por células rectangulares e a região interna por células poligonais e é onde se encontra a maior parte dos compostos fenólicos da película [6,9].

A película, do ponto de vista químico, é constituída por: celulose, ácidos orgânicos, minerais, flavonóides (flavonas e/ou antocianinas), aromas e taninos [10].

2.2.2. Polpa

A polpa representa cerca de 85% do total do bago e é composta por células largas e poligonais, de parede muito delgada e desorganizada, aquando da maturação do bago. Distinguem-se na polpa, como se apresenta na Figura 3, os feixes periféricos, que revestem a película, os feixes centrais, que alcançam as sementes e os feixes que ficam agarrados ao receptáculo e formam o pincel. As diversas zonas que constituem a polpa são delimitadas por vasos libero-lenhosos que permitem a alimentação do bago [6,8].

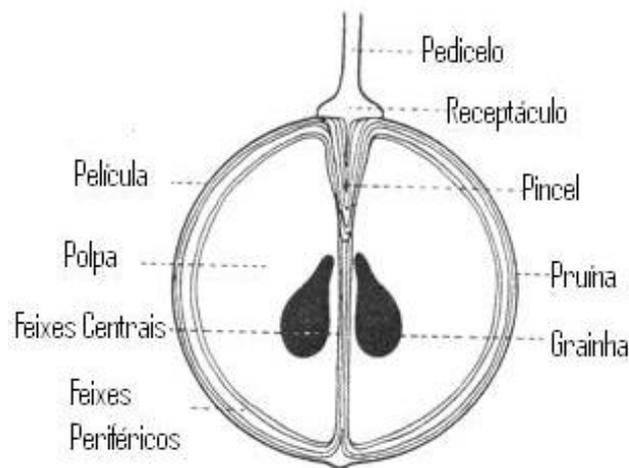


Figura 3: Corte esquemático do bago [5].

Os principais constituintes químicos da polpa são: os açúcares, os ácidos e substâncias azotadas e minerais [8].

2.2.3. Grainha

A grainha representa 2-5% do bago e é constituída por taninos e óleos. Normalmente existem 4 grainhas por bago, mas este número poderá variar de 0 a 9 [8].

2.3. Composição Química da Uva

O estudo da composição da uva é de extrema complexidade. O crescimento do bago e o seu desenvolvimento são o resultado de um longo e complexo ciclo reprodutivo, em que o crescimento de toda a planta influencia imenso o desenvolvimento desses processos e a composição química do fruto. Assim e embora, de planta para planta, se encontrem variações a nível químico, descrevem-se seguidamente, e de um modo geral, os principais constituintes químicos existentes.

2.3.1. Polissacarídeos

Os açúcares são compostos ternários constituídos por carbono, hidrogénio e oxigénio e contêm na sua cadeia carbonada, os grupos funcionais álcool e carbonilo.

Na uva, os monossacarídeos predominantes são: a glucose (sob a forma de D-glucopirranose) e a levulose (sob a forma de D-frutofuranose). Estes açúcares têm uma importância evidente durante o processo de vinificação, uma vez que são transformados em álcool por acção de leveduras (fermentação anaeróbia) e por serem redutores, ou seja, capazes de se oxidarem. A arabinose, a xilose, a metilpentose, a galactose e seus derivados, são açúcares não fermentáveis que existem em menor quantidade [8].

Os polissacarídeos são polímeros formados por oses e/ou ácidos urónicos unidos por ligações glicosídicas-O. No vinho e no mosto provêm das uvas e dos microrganismos, sendo um grupo extremamente heterogéneo e complexo de compostos [11].

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza e está associada a outros hidratos de carbono, como as hemiceluloses e as substâncias pécnicas.

2.3.1.1. Celulose

A celulose é um homopolímero natural $((C_6H_{10}O_5)_n)$ formado por unidades de β -D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Duas unidades adjacentes de glucose são ligadas por eliminação de uma molécula de água entre os grupos hidroxilo do carbono 1 (C1) de uma molécula e carbono 4 (C4) da outra molécula, originando a celobiose, unidade de repetição da cadeia de celulose (Figura 4) [12].

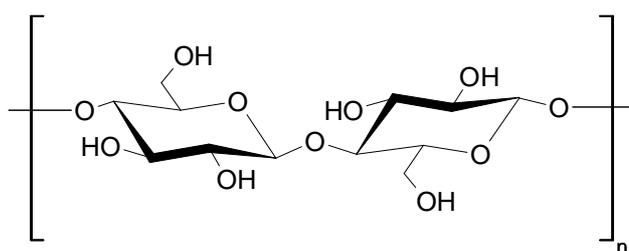


Figura 4: Estrutura da cadeia da celulose.

A configuração mais estável da celulose é na forma de cadeia com os grupos hidroxilos em posição equatorial. Os grupos OH que se encontram em ambos os extremos da cadeia têm comportamentos diferentes. O grupo OH do C1, é um grupo aldeído hidratado, que origina uma formação em anel por uma ligação intramolecular hemiacetal. Assim o terminal hemiacetal do C1 tem propriedades redutoras, enquanto o grupo OH livre

do C4 situado no extremo oposto da cadeia é um grupo hidroxilo alcoólico sem propriedades redutoras [12].

As moléculas de celulose são completamente lineares e têm uma forte tendência para formar ligações de hidrogénio inter e intramoleculares. As cadeias moleculares de celulose alinham-se em paralelo e formam microfibrilas, em que regiões muito ordenadas (cristalinas) alternam com regiões amorfas (menos ordenadas), sendo que o grau de cristalinidade da celulose na madeira varia de 60 a 70 %. Os grupos hidroxilos localizados nas regiões amorfas estão acessíveis e são reactivos participando facilmente em reacções químicas, o que não acontece com os grupos hidroxilos das regiões cristalinas, que são de difícil acesso. Como consequência da sua estrutura fibrosa e das suas ligações de hidrogénio, a celulose apresenta elevada resistência à hidrólise, sendo insolúvel na maioria dos solventes [13-15].

A celulose nativa em termos cristalográficos é denominada por celulose I devido à existência de várias formas polimórficas [12]. A celulose I obedece a um modelo de unidade cristalina (ou célula unitária) monoclinica, que apresenta três eixos (**a**, **b** e **c**) de comprimentos diferentes e o ângulo definido por dois desses eixos é diferente de 90°, como se representa na Figura 5.

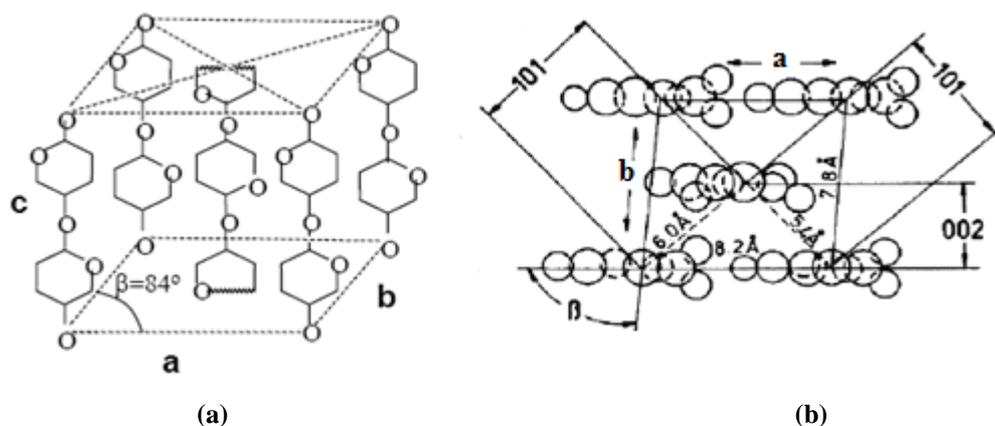


Figura 5: Célula unitária da celulose I (a) projectada no plano a-c (b) [16].

2.3.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos não celulósicos lineares e/ou ramificados. Os seus açúcares constituintes dividem-se maioritariamente em pentoses (D-xilose, L-arabinose) e hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose), mas também em ácidos hexurónicos (D-glucurónico, 4-O-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico) e desoxi-hexoses (L-ramnose, L-fucose). Devido ao baixo grau de polimerização e à sua natureza amorfa, as hemiceluloses são degradadas mais facilmente do que a celulose.

Apesar disso, ainda é necessário um sistema enzimático complexo para a sua degradação, devido à sua estrutura variável e ramificada [13,17].

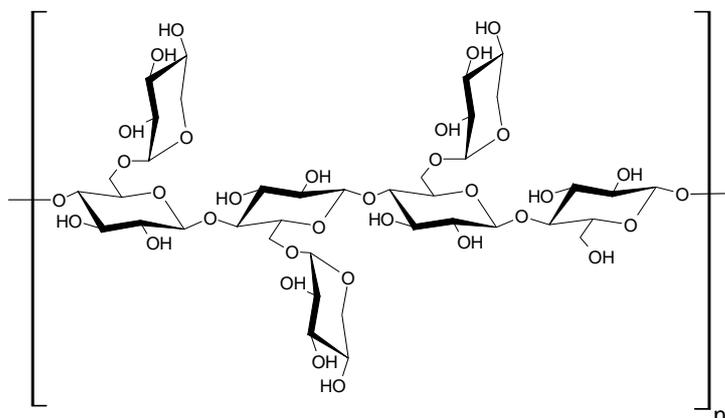


Figura 6: Estrutura da unidade de repetição da cadeia de xiloglucana.

As xiloglucanas são as hemiceluloses mais abundantes na parede celular das pelúcidas da uva e são constituídas por uma cadeia de unidades de glucose unida por ligações β -(1 \rightarrow 4), com ramificações de unidades de α -xilose em O-6 (Figura 6). As unidades de α -D-xilopiranosose podem ser substituídas em O-2 por unidades de β -D-galactopiranosose, que por sua vez podem ser substituídas em O-2 por unidades de α -L-fucose. Normalmente, a cadeia principal da xiloglucana da uva contém 3 unidades consecutivas de glucose substituída em O-6 por unidades de xilose e uma quarta unidade não ramificada, sem ramificações de galactose e de fucose [13,17].

Sendo a videira uma folhosa ainda se podem encontrar xilanas, glucomanas e galactanas.

As xilanas são polissacarídeos ramificados constituídos por uma cadeia principal de unidades de β -D-xilopiranosose, unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4). Por ligações α -(1 \rightarrow 2) ligam-se ramificações de ácido 4-O-metilglucurónico à cadeia principal e alguns grupos OH dos carbonos C2 e C3 podem ser substituídos por grupos O-acetil [13,17]. Na Figura 7, está representado um segmento de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana de folhosas.

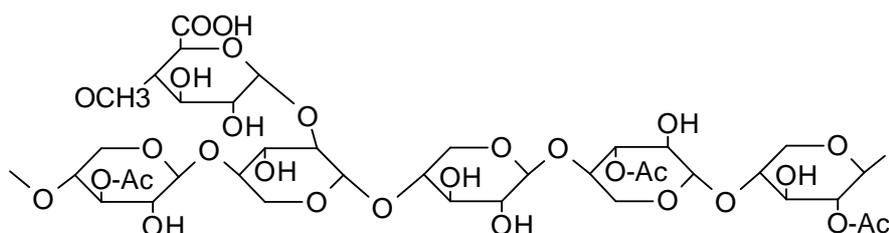


Figura 7: Estrutura da O-Acetil-4-O-Metilglucuronoxilana.

As glucomananas são constituídas por uma cadeia formada por unidades de β -D-glucopirranose e β -D-manopirranose, unidas por ligações (1 \rightarrow 4) [17].

As galactanas são muito ramificadas e são caracterizadas pelo seu conteúdo em unidades de ramnose [17].

2.3.1.3. Substâncias Pécnicas

As pectinas, os ácidos pécnicos, as protopectinas e gomas, segundo vários autores, fazem parte do grupo das substâncias pécnicas. Os ácidos pécnicos são cadeias formadas, quase exclusivamente, por unidades de ácido galacturónico. As pectinas são os derivados metilados dos ácidos pécnicos. Estão associadas à celulose e à hemicelulose [11].

As galacturonanas, as galactanas e as arabinanas, fazem parte do grupo das pectinas. As galacturonanas existem em muitas plantas, principalmente nas películas dos frutos e nas gomas. A ramnogalaturonana possui uma cadeia principal de unidades de ácido galacturónico unidas por ligações α (1 \rightarrow 4), que contêm unidades de ramnose em intervalos de 8 em 8 unidades, ligadas por ligações α (1 \rightarrow 2) e α (1 \rightarrow 4) às unidades adjacentes de ácido galacturónico. Algumas das unidades de ramnose possuem ramificações de galactanas. As arabinanas são constituídas maioritariamente por arabinose (90%), mas ainda por unidades de galactose, xilose e glucose, unidas por ligações α (1 \rightarrow 5) [13,17].

As substâncias pécnicas mais comuns nas uvas são as homogalacturonanas (homopolímero), as ramnogalacturonanas I e as ramnogalacturonanas II (heteropolímeros) [11].

2.3.2. Lenhina

A lenhina é um polímero aromático irregular, fortemente ramificado e constituído por unidades derivados de fenilpropano, substituídas por grupos hidroxilo e metoxilo, que confere coesão à estrutura fibrosa do tecido vegetal. Os diferentes tipos de ligação (ligações éter, ligações carbono-carbono) entre os seus monómeros tornam a sua estrutura extremamente complexa, que só pode ser definida pela abundância relativa das suas unidades constituintes: o *p*-hidroxifenilpropano, o guaiacilpropano e o seringilpropano [14,15, 18-20].

Os precursores da lenhina são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 8), que diferem entre si no número de grupos metoxilo substituintes do anel aromático [18].

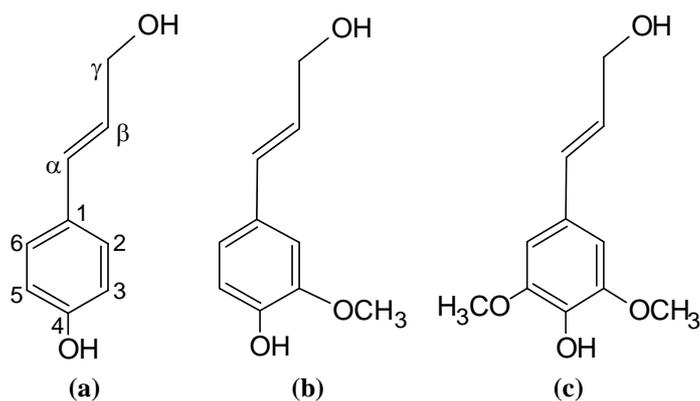


Figura 8: Estruturas dos álcoois precursores da lenhina: (a) *p*-cumárfílico, (b) coniferílico e (c) sinapílico.

Os grupos funcionais associados à lenhina são os grupos hidroxilo fenólicos e alifáticos e grupos aldeídos, cetonas e metóxidos. Ao contrário da celulose, a lenhina não pode ser despolimerizada nos seus monómeros iniciais.

2.3.3. Compostos alifáticos

Neste grupo de compostos estão principalmente incluídos os alcanos, os álcoois de cadeia longa e os ácidos gordos livres ou esterificados.

Na uva encontram-se essencialmente ácidos gordos. Os principais são os ácidos: oleico (C18, com uma dupla ligação, Figura 9) e linoleico (C18, com duas duplas ligações) [21].

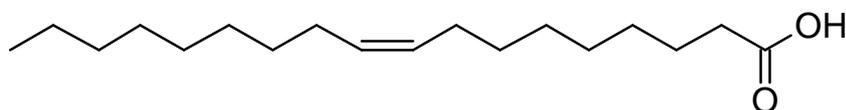


Figura 9: Ácido oleico.

2.3.4. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos da uva estão armazenados nos vacúolos da célula, sobretudo nos vacúolos da polpa, os principais são: o ácido tartárico, o ácido málico e o ácido cítrico (Figura 10) [22].

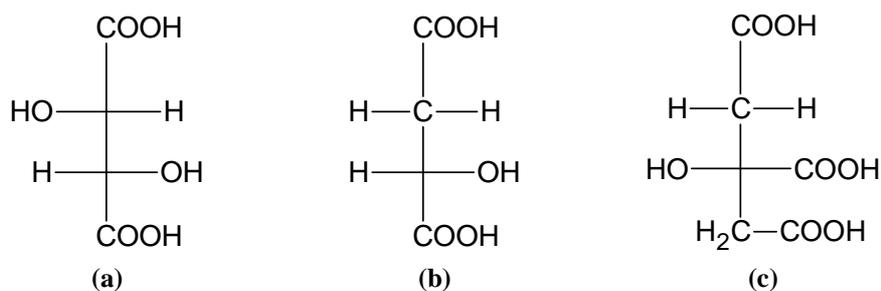


Figura 10: Estrutura química de (a) ácido tartárico, (b) ácido málico e (c) ácido cítrico.

2.3.5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo de compostos aromáticos com substituintes OH, do qual fazem parte os flavonóides, as antocianinas, os ácidos fenólicos e taninos [9].

2.3.5.1. Flavonóides e Antocianinas

Os flavonóides possuem uma estrutura química constituída por dois anéis benzénicos (A e B) ligados por um grupo pirano (anel C), sendo representados pela fórmula $C_6-C_3-C_6$ [23]. Nas uvas, estes compostos encontram-se sob a forma glicosídica. Os flavonóis, de pigmentação amarela, são os mais comuns. A quercetina é um pigmento encontrado tanto nas bagas tintas como nas brancas (Figura 11) [24].

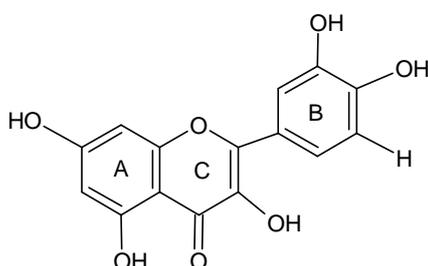


Figura 11: Estrutura química da quercetina.

As antocianinas são constituídas por dois anéis benzénicos unidos por um heterociclo catiónico, oxigenado e não saturado e podem estar sob a forma glicosídica (antocianinas), mais estável, ou sob a forma aglicone (antocianidina - Figura 12) [24].

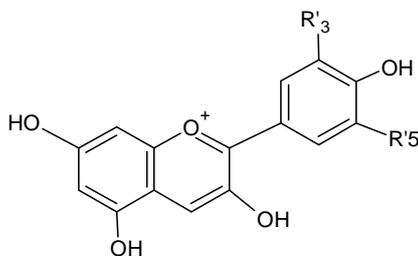


Figura 12: Estrutura da antocianidina.

2.3.5.2. Ácidos Fenólicos

Os ácidos benzóicos (C_6-C_1) e os ácidos cinâmicos (C_6-C_3), assim como os seus respectivos derivados (Figura 13), pertencem aos ácidos fenólicos [24].

Os ácidos benzóicos estão presentes nas uvas, maioritariamente, como combinações glicosídicas e como ésteres, os quais podem ser extraídos por hidrólise ácida e por hidrólise alcalina, respectivamente. Os ácidos cinâmicos estão principalmente esterificados, especialmente com o ácido tartárico.



1	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	2
<i>p</i> -hidroxibenzóico	H	H	OH	H	<i>p</i> -cumárico
Protocatéico	H	OH	OH	H	Caféico
Vanílico	H	OCH ₃	OH	H	Ferúlico
Gálico	H	OH	OH	OH	-
Siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Sinápico
Salicílico	OH	H	H	H	-
Gentísico	OH	H	H	OH	-

Figura 13: Ácidos fenólicos presentes nas uvas: (1) benzóicos e (2) cinâmicos [24].

2.3.5.3. Taninos

Os taninos são compostos vegetais pertencentes aos polifenóis, capazes de se co-polimerizar com proteínas e polissacarídeos e possuem uma massa molecular que varia de 600 a 3500 [24].

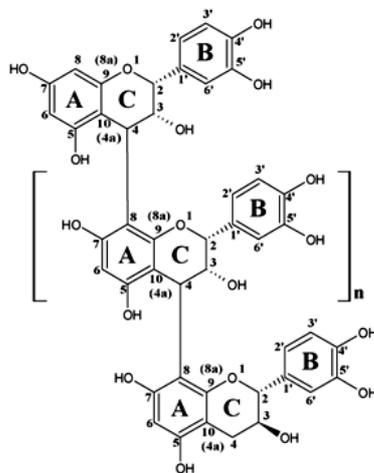


Figura 14: Estrutura da procianidina (tanino condensado) [26].

Os taninos podem ser divididos em hidrolisáveis ou condensados. Os taninos hidrolisáveis são um grupo de substâncias que após hidrólise originam açúcares (principalmente glucose) e ácidos gálico e elágico. Os taninos condensados são formados por policondensação dos flavonóides catequina (3-flavanol) e leucoantocianidina (3,4-flavanodiol), na Figura 14 apresenta-se a estrutura da procianidina [25].

Nas uvas apenas existem os taninos condensados, que resultam da co-polimerização do ácido catéquico com substâncias glucídicas e por isso também denominados por taninos catéquicos [24].

2.3.6. Aromas

O aroma do bago da uva provém da justaposição de diferentes compostos (álcoois, hidrocarbonetos, aldeídos e ésteres), mais ou menos voláteis, tanto os odoríferos como os precursores de aroma que dependem de muitas variáveis como da casta, do clima e do solo onde se desenvolve. Os aromas estão localizadas nas células hipodérmicas, essencialmente na película, todavia em algumas castas também poderão estar presentes na polpa e dividem-se em: terpenóides, derivados de norisoprenóides, metoxipirazinas e tióis [5,8].

2.3.6.1. Terpenos e Terpenóides

Os terpenos e seus derivados são uma vasta família de compostos presentes na natureza, que se podem encontrar na forma livre com propriedades odoríferas, ou ligada sem propriedades odoríferas [27].

Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno: monoterpénos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterterpenos (5 unidades), triterpenos (6 unidades), tetraterpenos (8 unidades) e politerpenos (> 8unidades), alguns dos quais representados na Tabela 2 [28].

Tabela 2: Estruturas base de terpenos.

Nome	Números de 5-C unidades	Estrutura
Isopreno (unidade básica)	1	
Monoterpenos	2	
Sesquiterpenos	3	
Diterpenos	4	
Triterpenos	6	

Os terpenóides são terpenos que possuem grupos funcionais específicos, como os grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo e funções éster [28].

Os monoterpenos são o grupo mais importante dos terpenos nas uvas e encontram-se na forma de hidrocarbonetos simples como o limoneno (Figura 15 (a)) e o mirceno, de aldeídos (linalal, geranial), de álcoois (linalol, geraniol), de ácidos (ácidos linálico e gerânico, Figura 15 (b)) e de ésteres (acetato de linalil) [5, 27].

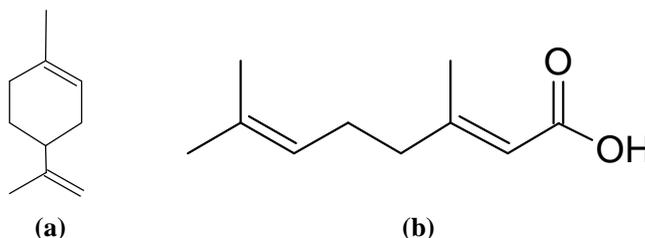


Figura 15: Estruturas do (a) limoneno e do (b) ácido gerânico.

2.3.7. Substâncias Azotadas

O azoto exerce uma acção fundamental nos sistemas orgânicos. As substâncias azotadas são sintetizadas pelos organismos vivos, constituindo o azoto orgânico, que se pode apresentar sob as formas: monomérica (aminoácidos), polimérica (polipéptidos) e complexa (proteínas) [29].

Os aminoácidos são constituídos por grupos amina e carboxilo. O ácido glutâmico, a arginina, a trionina e a prolina constituem 65% dos ácidos aminados da uva [8].

Os polipéptidos resultam da polimerização dos aminoácidos. A função amina de uma molécula actua sobre a função ácida da molécula vizinha, dando-se a eliminação de uma molécula de água que conduz à formação de pontes pépticas com estrutura rígida e plana - polimerização por condensação.

As proteínas, são cadeias de aminoácidos ligadas por cadeias péptidas e como tal, a configuração espacial das proteínas é determinada pela sequência de aminoácidos nas cadeias polipéptidas. Segundo Navarre, as proteínas representam apenas 3% do azoto orgânico (sob a forma de azoto amoniacal) da uva [8].

2.3.8. Matérias Minerais

As matérias minerais dizem respeito aos sais. A maior parte das substâncias minerais das uvas estão na forma de sais de potássio ou de cálcio, representando, 2 a 3% do peso da película e 1 a 2% do peso da polpa [8].

2.4. Processo de vinificação

A vinificação é o conjunto de operações necessárias para transformar o sumo de uva em vinho.

Diferentes tipos de vinho correspondem a diferentes técnicas de vinificação, que se caracterizam de acordo com a separação dos diferentes tecidos da uva. Para evitar a adstringência do vinho, deve-se separar o engaço do restante cacho (desengace), nomeadamente para a obtenção de vinho tinto [30].

2.4.1. Vinificação em tinto

Na vinificação em tinto, ocorre a dilaceração do bago – processo de maceração ou curtimenta, através de esmagadores mecânicos. A fermentação efectua-se assim, com as películas em infusão no mosto, que consoante a intensidade de cor pretendida, pode ser mais ou menos prolongada. Após a fermentação, inicia-se a deposição de materiais, que formam uma massa sólida e heterogénea, constituída por: películas, grainhas e eventualmente engaço, denominada de bagaço, o qual é separado da parte líquida – o vinho [8,30].

2.4.2. Vinificação em branco

Na vinificação em branco, não ocorre a maceração das partes sólidas do cacho, mas unicamente a fermentação do sumo de uva [8,30].

3. SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO

Os subprodutos da vinificação designam os produtos resultantes das diferentes operações decorrentes da tecnologia de fabrico de vinho, sendo estes: bagaço, folhelho, grainhas, engaço, borras e sarro, da sua industrialização podem surgir diversos produtos, como a aguardente, o álcool etílico e o ácido tartárico [31].

O aproveitamento dos subprodutos vitivinícolas tem sido alvo de grande interesse devido a importância económica do sector aliada aos seus problemas ambientais. Como tal é importante conhecer a contribuição e a respectiva composição destes subprodutos.

Na Tabela 3, apresentam-se os subprodutos obtidos e a composição dos mesmos de acordo com o tipo de vinificação, tendo em conta que na produção de 100 L de vinho são gerados subprodutos na ordem dos 31,17 kg para a vinificação em branco e 25 kg para a vinificação em tinto [31,32].

Tabela 3: Composição dos subprodutos resultantes da produção de vinho [32].

Subprodutos		Vinificação (kg/hL vinho)	
		Branco	Tinto
Bagaço	Folhelho	17	13,5
	Grainha	4	4
	Engaço	4	3
Borra (liquida)		6	4,4
Sarro		0,17	0,10

3.1. Caracterização dos Subprodutos da Vinificação

O bagaço da uva, sendo o principal subproduto da vinificação, toma definições distintas segundo a tecnologia de vinificação utilizada. Assim, o bagaço que provém da laboração de uvas segundo o processo de “bica aberta” (fabrico de vinhos brancos ou *rosé*) não fermenta com os mostos e é designado por bagaço doce ou fresco. Por sua vez, o bagaço que provém de “massas vnicas” (constituídas pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto que as embebe), que já sofreram fermentação, geralmente resultante do fabrico de vinhos tintos, designa-se por bagaço tinto ou fermentado [31].

Há vários factores que influenciam a composição química do bagaço, nomeadamente: a natureza das castas, o modo de vinificação, as condições atmosféricas e o tipo de solo a que a vegetação da vinha está sujeita. O que por sua vez determinam a

composição das uvas, os sistemas de condução da vinha e o estado higiénico das uvas no momento da colheita [32].

O bagaço é constituído por água, cerca de 60%, vinho e borras (dependentes da prensagem), álcoois, principalmente o etanol, aldeídos, ésteres, ácidos voláteis, polifenóis, taninos, celulose, proteínas, pectinas, sais minerais e resíduos de hidratos de carbono [31,32]. Na Tabela 4 apresentam-se alguns parâmetros da composição química do bagaço de acordo com o processo de vinificação.

Tabela 4: Composição dos bagaços [31].

Parâmetros	Bagaço	
	Branco	Tinto
Humidade (%)	55-65	50-55
Açúcar (g/kg)	80-110	2-4
Álcool (L/100 kg)	---	2,0-4,0
Bitarbarato de potássio (g/%)	1,5-3,0	2,0-4,0
Acidez volátil (g/kg) (ácido acético)	---	0,4-1,0

Este trabalho centrou-se no estudo do folhelho e como tal é-lhe dada maior importância.

3.1.1. Folhelho

O folhelho é constituído essencialmente pelas películas das uvas, após desidratação e separação das grainhas e engaço. O folhelho pode ser valorizado como adubo, para alimentação animal e ainda como combustível [31,32]. A composição química do folhelho está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição do folhelho [31,32].

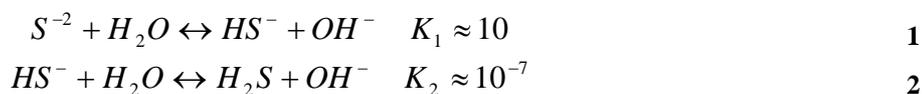
Parâmetros	Composição (%)
Matérias Minerais	2,7 – 8,9
Matérias gordas	5,2 – 7,8
Proteínas	10,0 – 15,6
Celulose	20,0 – 27,0
Taninos	0,2 – 0,6
Matérias azotadas	3,3 – 3,9

4. PROCESSOS QUÍMICOS DE PRODUÇÃO DE PASTAS CELULÓSICAS

A produção de pasta envolve a separação das fibras de celulose, principalmente da madeira, por processos químicos, semiquímicos, quimiomecânicos ou mecânicos. Os processos químicos promovem a degradação e dissolução da lenhina, de modo a preservar o máximo possível dos polissacarídeos (celulose e hemiceluloses). Ao longo deste trabalho foram efectuados apenas tratamentos químicos (kraft e perácido) ao folhelho para obtenção de pastas.

4.1. Cozimento kraft

O processo kraft ou processo de cozimento ao sulfato é um método que promove a remoção da lenhina em meio alcalino (pH superior a 12) a 170°C, utilizando um licor, denominado de licor branco, que têm essencialmente dois constituintes base: o hidróxido de sódio, NaOH e o sulfureto de sódio, Na₂S. As espécies activas neste licor de cozimento são os iões hidróxido e hidrogenossulfureto, que resultam de reacções do NaOH e Na₂S com a água [33]. As reacções que traduzem os equilíbrios envolvidos nos licores de cozimento são dadas pelas equações 1 e 2.



Um dos parâmetros de controlo do cozimento é a concentração dos reagentes, em que as quantidades de Na₂S e NaOH são relativas à quantidade de madeira (Tabela 6).

Tabela 6: Termos utilizados no cozimento kraft.

Termos	Definição
Alcáli activo (AA)	[NaOH + Na ₂ S], (g/L)
Alcáli efectivo (AE)	[NaOH + ½ Na ₂ S], (g/L)
Sulfidez ou índice de sulfureto (S)	[Na ₂ S] / [NaOH + Na ₂ S], %
Hidromódulo	V (licor, L) / m (madeira, kg)
Consistência	m (pasta seca, Kg) / m (suspensão, kg)

A possibilidade de se poder processar qualquer espécie de madeira, originando uma pasta de elevada resistência e o facto de se poder recuperar energia e produtos químicos de

maneira muito eficiente, constituem as principais vantagens deste método. As desvantagens deste processo devem-se, principalmente, aos baixos rendimentos obtidos devido às perdas de polissacarídeos e no facto do enxofre, na sua forma reduzida, provocar emissões com odor extremamente desagradável [34].

4.1.1. Reacções da lenhina durante o cozimento kraft

A degradação da lenhina depende da clivagem das ligações éter (essencialmente β -O-4, Figura 16, e α -O-4), uma vez que as ligações carbono-carbono são muito estáveis. A forte nucleofilicidade do ião hidrogenossulfureto facilita a deslenhificação. Os iões OH^- e HS^- provocam a clivagem das ligações éter, levando à libertação de grupos hidroxilo das unidades fenólicas e ao aumento do carácter hidrofílico da lenhina. A lenhina degradada é dissolvida sob a forma de fenolatos de sódio, no licor de cozimento [33].

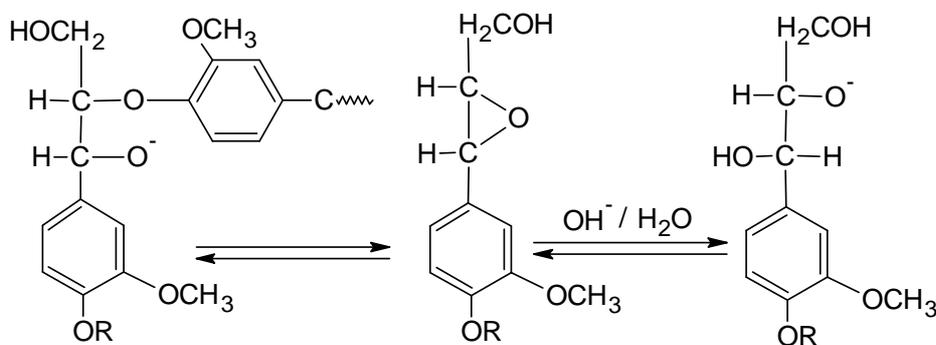


Figura 16: Clivagem de ligações β -O-4 em estruturas fenólicas eterificadas.

A degradação alcalina da lenhina, durante o cozimento kraft, tem vindo a ser exaustivamente estudada através de compostos modelo, que representam várias unidades estruturais da lenhina, tendo sido identificadas três possíveis reacções de clivagem [35]:

1. Clivagem de ligações α -aril éter das unidades fenólicas através de intermediários de metileno quinona. Os grupos fenólicos adicionais formados nestas reacções aumentam a solubilidade da lenhina, tornando-a mais susceptível a outro tipo de reacções.
2. Clivagem de ligações β -aril éter das unidades fenólicas através dos intermediários de episulfureto. Os intermediários quinónicos reagem mais rapidamente com o ião sulfureto do que com o hidróxido. O que explica o facto de haver uma maior degradação no cozimento kraft do que no soda, onde só existe o ião hidróxido.
3. Clivagem de ligações β -aril éter das unidades não fenólicas através dos intermediários de epóxido. Os grupos fenólicos são libertados nesta reacção

levando à completa separação das suas unidades vizinhas, formando-se assim fragmentos de menor peso molecular e mais solúveis, modificando a estrutura da lenhina.

A degradação da lenhina é muito mais complexa, não se baseando unicamente nas reacções descritas anteriormente. Os rendimentos obtidos também são inferiores aos esperados, devido à ocorrência de reacções de condensação em simultâneo: nestas reacções, os carboaniões, formados durante a degradação da lenhina, competem com os aniões nucleofílicos (S^{2-} , HS^- e OH^-) do licor de cozimento, principalmente com os intermediários metileno quinonas [35].

4.1.2. Reacções dos hidratos de carbono durante o cozimento kraft

A degradação alcalina dos polissacarídeos leva a uma perda considerável de hidratos de carbono. Logo no início do cozimento os grupos acetil das hemiceluloses são hidrolisados. Nos estágios iniciais, cadeias de polissacarídeos sofrem *peeling* primário nos grupos terminais redutores. Entretanto, vão-se formando novos grupos terminais como resultado da hidrólise alcalina das ligações glicosídicas, que ocorre a elevadas temperaturas, levando a uma degradação adicional (*peeling* secundário). Assim o teor de celulose é reduzido, mas não tanto como o teor de hemiceluloses que são degradadas em maior escala, uma vez que são polissacarídeos de estrutura amorfa e de baixo peso molecular. A reacção de *peeling* é finalmente interrompida pela reacção de *stopping* (Figura 17) que converte os terminais redutores em grupos de ácido carboxílico estáveis [33].

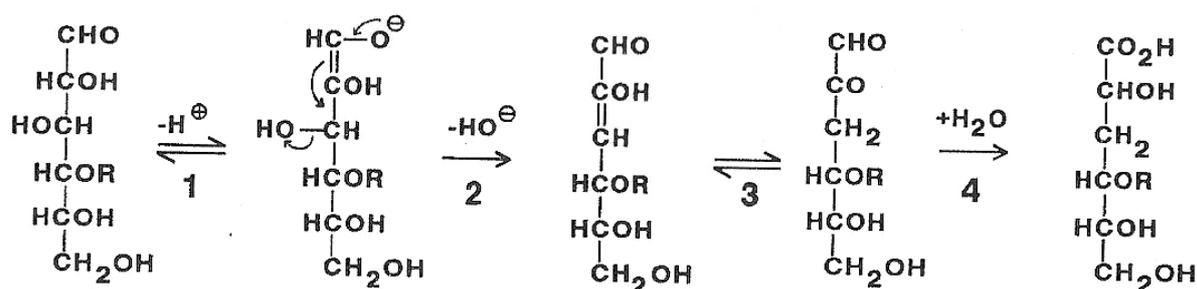
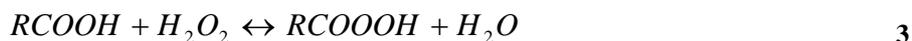


Figura 17: Mecanismo da reacção de *stopping*: formação do 1,2-enodiol (1), eliminação β -hidroxilo (2), tautomerização (3), rearranjo benzílico para ácido glucometassacárico (4) [33].

4.2. Tratamento com perácidos

Os perácidos são utilizados na remoção da lenhina assim como no branqueamento de pastas celulósicas. O método mais usual para a sua preparação consiste na oxidação do ácido carboxílico correspondente com peróxido de hidrogénio (Equação 3). Também se

podem produzir perácidos pela reacção entre anidridos de ácidos carboxílicos e peróxido de hidrogénio, que dão origem a soluções anidras e de maior concentração [36,37].



O ácido peracético (AP) é um dos perácidos mais estudados e pode ser preparado pela oxidação do ácido acético com peróxido de hidrogénio. No entanto, a concentração de AP deve ser igual ou mesmo inferior às concentrações de ácido acético e de peróxido de hidrogénio, uma vez que os reagentes que não reagirem podem danificar as fibras de celulose. Porém, se for usado ácido peracético destilado a degradação das fibras é evitada, além de se verificar uma diminuição do custo dos reagentes [38,39].

O ácido peracético em solução possui uma ligação intramolecular por pontes de hidrogénio muito forte, levando à formação de um anel de 5 lados estável e talvez por isso possui um pKa (8,2) muito superior ao do ácido acético (4,76) [37,40].

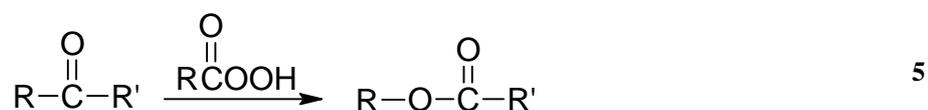
Os perácidos, em solução, são mais voláteis e menos ácidos do que os ácidos carboxílicos correspondentes, podendo ser separados destes e destilados após a reacção e reintroduzidos novamente no processo, levando a uma diminuição de custos em solventes e consequentes benefícios ambientais. A fácil recuperação de solvente e o controlo eficiente de poluição representam as grandes vantagens da utilização deste tipo de processo de produção de pasta [36].

4.2.1. Reacções de Perácidos com Lenhina

A reacção mais característica dos perácidos é a transferência electrofílica de oxigénio, em que os átomos de oxigénio dos perácidos são transferidos para os nucleófilos do substrato que possuem um par de electrões de ligação π (equação 4) [36].



O ião hidroxónio, deficiente em electrões reage rapidamente com os vários locais da lenhina ricos em electrões, como as estruturas olefínicas e anéis aromáticos, causando a degradação da macromolécula. É de notar que, as ligações alifáticas carbono-hidrogénio também são hidroxiladas por perácidos [36]. A oxidação de aldeídos e cetonas por perácidos é denominada de oxidação *Baeyer-Villiger* (equação 5) [36,41].



A maioria dos estudos comportamentais da lenhina com perácidos foi efectuada com ácido peracético. Na Figura 18 são apresentadas as reacções mais importantes entre a lenhina e os perácidos [36].

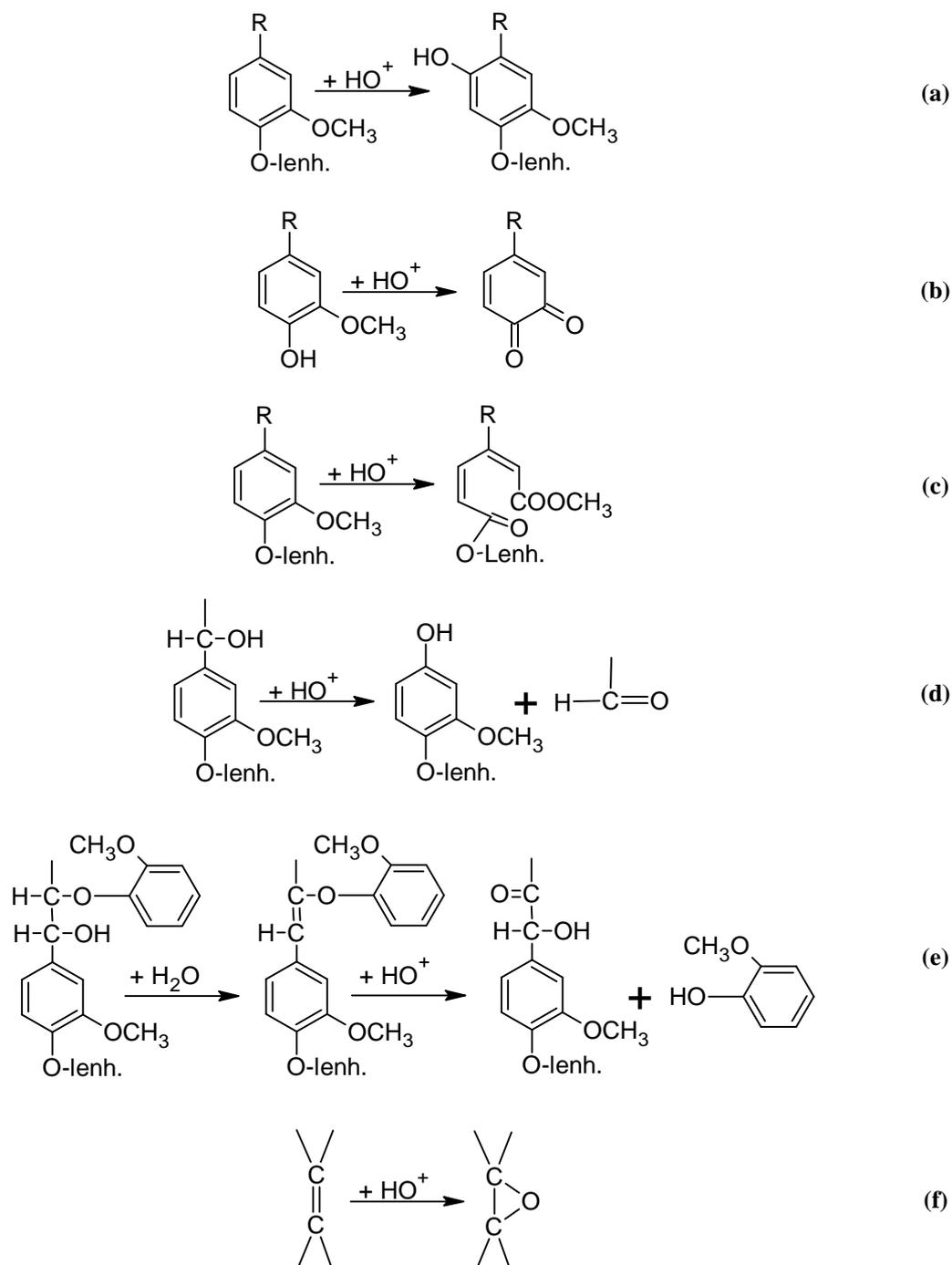


Figura 18: Principais reacções da lenhina com perácidos: (a) hidroxilação do anel aromático, (b) desmetilação oxidativa, (c) abertura do anel aromático por oxidação e formação de derivados do ácido mucónico, (d) substituição de cadeia, (e) clivagem de ligações β -aryl éter, (f) epoxidação.

4.2.2. Reacções de Perácidos com Polissacarídeos

Os grupos hidroxilo de álcoois presentes nos polissacarídeos não providenciam locais de reacção para ataques electrofílicos pelo ião hidroxónio, como tal os hidratos de carbono não são extensivamente degradados durante a deslenhificação por perácido. No entanto, as ligações oxigénio-oxigénio nos perácidos são facilmente clivadas por redução de um electrão levando à formação de radicais. Os grupos hidroxilo alifáticos podem ser oxidados por perácidos na presença de iões metálicos, que funcionam como catalisadores, formando grupos carbonilo [36].

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo procede-se à descrição dos métodos utilizados para a caracterização química das amostras de folhelho de uva e das pastas obtidas, assim como para a preparação das mesmas. As metodologias usadas ao longo deste trabalho são na sua maioria, adaptações aos procedimentos utilizados para análise de madeiras, de modo a melhor se aplicarem ao material em estudo.

1. MATERIAIS

Este trabalho foi realizado com folhelho de uva, resultante de bagaço fermentado, obtido a partir da vinificação em tinto de uvas da casta Touriga Nacional. O folhelho, cedido pela Adega Cooperativa de Silgueiros, em Outubro de 2007, foi conservado à temperatura ambiente após ser-lhe retirada a humidade. Tendo em conta as análises realizadas ao longo de todo o procedimento laboratorial, utilizaram-se solventes e reagentes, na sua maioria, comerciais de pureza analítica (*p.a.*).

2. ANÁLISE QUÍMICA DO FOLHELHO DE UVA E DAS PASTAS

2.1. Teor de Humidade

O teor de humidade foi determinado pela secagem de cerca de 1g de folhelho, a 105°C numa estufa, até peso constante. Com a obtenção da massa das amostras secas, o teor de humidade foi calculado pela equação 6.

$$W(\%) = \left(1 - \frac{\text{massa de amostra seca}}{\text{massa de amostra inicial}} \right) \times 100 \quad 6$$

2.2. Cinzas

O teor de cinzas (fracção inorgânica) foi determinado pela incineração da parte orgânica, em que cerca de 1g de amostra de folhelho foi calcinada numa mufla a 525°C, durante 3 horas (equação 7).

$$Z(\%) = \frac{\text{massa de cinzas}}{\text{massa de amostra seca}} \times 100 \quad 7$$

2.3. Extractáveis

Para a determinação do teor de extractáveis e para a preparação de amostras livres de extractáveis, submeteram-se 10 g de folhelho a uma extracção Soxhlet com 200 mL de solvente (acetona ou diclorometano), durante 4 horas, à ebulição. Após arrefecimento e desmontagem do extractor, o solvente foi evaporado num evaporador rotativo. Finalmente, a amostra foi colocada numa estufa a 105 °C depois da eliminação do restante solvente e possível água da amostra. O extracto resultante foi pesado. O teor de extractáveis foi calculado pela equação 8.

$$E (\%) = \frac{\text{massa de extractáveis}}{\text{massa de amostra seca}} \times 100 \quad 8$$

As amostras extraídas (sem extractáveis em acetona (s/EA) e sem extractáveis em diclorometano (s/ED)) foram secas à temperatura ambiente, para posteriores análises.

2.4. Extractáveis em água

Para a determinação de extractáveis em água, 1g de folhelho pré-extraído com acetona foi submetido a refluxo com uma solução de citrato de amónio (0,10g/mL), durante 1 hora. Seguidamente, o resíduo foi filtrado através de um filtro de porosidade G2 e lavado com água quente. Após a sua secagem a 105°C, o resíduo foi pesado. O cálculo da massa de extractáveis foi obtido a partir da diferença entre a massa pesada e a massa inicial da amostra. O valor do teor de extractáveis água foi calculado a partir da equação 9.

$$\text{Extractáveis em água (\%)} = \frac{\text{massa de extractáveis em água}}{\text{massa de amostra seca}} \times Ke \times 100 \quad 9$$

2.4.1. Substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol.

A preparação da amostra foi efectuada a partir de 10g de folhelho foram submetidos a uma extracção Soxhlet com acetona durante 8 horas. Seguidamente, cerca de 1 g de extracto obtido foi sujeita a refluxo, durante 1 hora, com 50 mL de solução de citrato de amónio (0,10g/mL). De modo a facilitar a precipitação, acidificou-se a mistura com etanol até pH 2,5 e conservou-se no frio. Após 12h, o sobrenadante foi decantado e o precipitado resultante foi lavado sucessivamente com etanol e metanol. O resíduo final (SSP) foi então devidamente seco e analisado por RMN de ¹H e de correlação ¹H-¹H (TOCSY), tendo também sido determinados os seus açúcares neutros.

2.5. Celulose Kürscher e Höffer

O teor de celulose foi determinado pela aplicação do método de *Kürscher e Höffer* que consiste no tratamento das amostras com uma solução etanólica ácida, obtendo-se a celulose como um resíduo insolúvel.

Cerca de 1 g de folhelho livre de extractáveis (s/ED) foi sujeita a refluxo com 50 mL de solução de HNO₃ e etanol (1:4, v/v) durante uma hora, a 100 °C. A solução foi então retirada por decantação, adicionaram-se mais 50 mL da mesma solução de HNO₃ em etanol e procedeu-se a um novo refluxo por mais 1 hora. Este procedimento foi repetido. Por fim, filtrou-se o resíduo num cadinho de porosidade G4 e lavou-se com etanol aquoso e com água quente até sua neutralização. Colocou-se o filtro G4 com celulose na estufa a 105 °C até atingir um peso constante.

O teor de celulose das amostras, corrigido para o teor de extractáveis, foi determinado a partir da equação 10.

$$Celulose(\%) = \frac{massa\ de\ celulose}{massa\ de\ amostra\ seca} \times Ke \times 100 \quad 10$$

em que, $Ke = (100 - E)/100$ (equação 8, página 28)

2.6. Proteínas

Para a quantificação das proteínas, adicionaram-se 200 mL duma solução de HCl 0,1N contendo 1% (m/v) de pepsina, a 5 g de folhelho livre de extractáveis, num erlenmeyer. Este erlenmeyer, devidamente fechado, foi de seguida colocado num banho de água a 37 °C, com agitação. Após 24 h, filtrou-se a mistura num cadinho G2 (devidamente calibrado e pesado) e lavou-se com água destilada quente, até pH neutro das águas de lavagem. Por fim, determinaram-se as proteínas, por diferença de massa e após secagem na estufa a 60 °C [42].

O teor de proteínas, corrigido para o teor de extractáveis e cinzas, foi calculado pela equação 11.

$$P(\%) = \frac{massa\ de\ proteínas}{massa\ de\ amostra\ seca} \times Ke \times 100 \quad 11$$

2.7. Taninos

Para a determinação de taninos, procedeu-se ao refluxo de 4 g da amostra resultante do procedimento anterior (secção 2.6) com 200 mL de NaOH 0,1 M, durante 1 hora à ebulição, sob atmosfera de azoto. A amostra resultante foi filtrada num cadinho G4 e

lavada até neutralização. Por fim, secou-se na estufa a 70 °C. O teor de taninos foi calculado pela equação 12 e corrigido para o teor de extractáveis, cinzas, proteínas e também para o valor de extractáveis em água quente.

$$T(\%) = \frac{\text{massa de taninos}}{\text{massa de amostra seca}} \times Ke \times Kp \times 100 - E_{H_2O} \quad 12$$

em que, $Kp = (100 - P)/100$ (equação 11) e E_{H_2O} são os extractáveis em água (equação 9).

2.8. Lenhina Klason

O teor de lenhina insolúvel em ácido foi determinado pela aplicação do método de *Klason*, segundo Tappi standard T 204 om-88, que quantifica a lenhina como resíduo sólido, e calculado pela equação 13.

$$L(\%) = \frac{\text{massa de lenhina}}{\text{massa de amostra seca}} \times Ke \times Kp \times Kt \times 100 \quad 13$$

em que, $Kt = (100 - T)/100$ (equação 12, página 30).

A uma amostra de folhelho livre de extractáveis, proteínas e taninos (*ca.* 1g) adicionaram-se 15 mL de ácido sulfúrico a 72%. Após 2h30 de reacção, com agitação periódica e à temperatura de 25°C, diluiu-se a solução com 250 mL de água e procedeu-se ao seu refluxo, durante 1 hora.

A solução resultante foi filtrada através de um cadinho filtrante de porosidade G4, lavando-se o resíduo insolúvel (lenhina) com água quente até à neutralização das águas da lavagem. Por fim, quantificou-se a massa da lenhina, após secagem na estufa a 105 °C.

A percentagem de lenhina insolúvel foi corrigida para o teor em extractáveis, cinzas, proteínas e taninos.

2.9. Açúcares Neutros

A quantidade relativa dos monossacarídeos determinou-se por cromatografia gás-líquido após a hidrólise das amostras com ácido sulfúrico e derivatização a acetato de alditol. As amostras analisadas foram: o folhelho, as substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol e a pasta.

Os polissacarídeos foram hidrolisados por tratamento de cerca de 10 mg de amostra com 400 µL de H₂SO₄ a 72%, a 20°C durante 3 horas, após a adição de 4,4 mL de água efectuou-se uma nova hidrólise a 100°C durante 2h30. Arrefeceu-se o hidrolisado e adicionaram-se 200 µL de 2-desoxiglucose (20 mg/mL) como padrão interno. A 1 mL desta mistura adicionaram-se 200 µL de NH₃ a 25% e 100 µL de uma solução de NH₃ a

3M contendo 150 mg/mL de NaBH₄, ocorrendo a redução dos monossacarídeos a alditóis durante 1 h a 30°C. Para a decomposição do excesso de NaBH₄, foi adicionado ácido acético glacial por 2 vezes. A acetilação dos alditóis foi feita por adição de 0,45 mL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético a 0,3 mL da mistura anterior. Esta solução foi mantida a 30°C durante 30 minutos. Os acetatos de alditol foram de seguida extraídos com diclorometano e a fase orgânica foi lavada várias vezes com água. O solvente foi evaporado sob atmosfera de azoto. A quantificação de cada monossacarídeo foi feita num cromatógrafo de gás Varian 3350, equipado com uma coluna capilar DB-225 J&W (30 m comprimento × 0,25 mm diâmetro interno, com 0,15µm de espessura de filme) acoplada a um detector FID, usando N₂ como gás de arraste, após injeção de 0,5 µL de amostra (dissolvida em 100 µL de acetona). As rectas de calibração utilizadas foram obtidas utilizando-se rectas de calibração previamente elaboradas a partir de soluções padrão. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injector 220°C, temperatura da coluna 220°C e temperatura do detector 230°C.

2.10. Isolamento e Caracterização Estrutural da Cutina

2.10.1. Extração

Cerca de 2 g de pasta foram submetidas a uma extração Soxhlet com 200 mL de diclorometano, durante 3 horas. O extracto foi quantificado após evaporação do solvente (equação 14).

$$ED(\%) = \frac{\text{massa de ED}}{\text{massa de pasta}} \times 100 \quad 14$$

em que, ED são os extractáveis da pasta.

2.10.2. Metanólise dos Extractos

Dissolveram-se cerca de 145 mg do extracto obtido anteriormente em 50 mL de metanol absoluto e procedeu-se à extração, durante 2 horas, após a adição de 40 mg de MeONa. A solução resultante foi acidificada (pH=6) e submetida a uma extração líquido-líquido com clorofórmio (3x100 mL) com adição prévia de 15 mL de água destilada. Por fim, a solução combinada de clorofórmio foi filtrada sobre NaSO₄ anidro, o solvente evaporado até à sua secura e o extracto metanólico foi quantificado pela equação 15.

$$EDM(\%) = \frac{\text{massa de EDM}}{\text{massa de pasta}} \times 100 \quad 15$$

em que, EDM são os extractáveis da pasta depois da metanólise.

2.10.3. Metanólise da Pasta livre de Extractáveis

A mistura de 1 g de amostra de pasta livre de extractáveis, 200 mL de MeOH e 0,120 g de MeONa foi sujeita a refluxo, durante 3 horas. Após a extracção, filtrou-se a solução através de um filtro de porosidade G4 (seco e previamente pesado), adicionaram-se 60 mL de MeOH. Procedeu-se a nova extracção durante 15 minutos e filtrou-se a solução sobre o filtrado anterior. Acidificou-se o filtrado, adicionaram-se 75 mL de água destilada e extraiu-se por 3 vezes, com 100 mL de clorofórmio. Por fim, a solução combinada de clorofórmio foi filtrada sobre NaSO₄ anidro, o solvente evaporado até à sua secura e o extracto metanólico foi quantificado (equação 16).

$$LED(\%) = \frac{\text{massa de LED}}{\text{massada pasta}} \times 100 \quad 16$$

em que, LED é a amostra de pasta livre de extractos após metanólise.

2.10.4. Caracterização Estrutural

Cerca de 10 mg de cada extracto (antes e após metanólise) foram dissolvidos em 250 µL de piridina e os compostos contendo grupos hidroxilo e carboxilo livres foram convertidos em éteres e ésteres trimetilsililados (TMS), respectivamente, por adição de 250 µL de BSTFA e de 50 µL de trimetilclorosilano. As misturas permaneceram a 70°C durante 40 min e posteriormente foram analisadas por GC-MS.

A análise por GC-MS foi efectuada usando um cromatógrafo Trace Gas Chromatograph 2000 series, equipado com um espectrómetro de massa Finnigan Trace MS, corporation, usando hélio como gás de arraste (30 mL/min), equipado com uma coluna capilar DB-1 J&W (30 m × 0,32 mm diâmetro interno), 0,25 µm de espessura de filme), tendo sido usadas as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial: 80°C (5 min); gradiente de temperatura: 4°C/min (até 250°C); temperatura final: 285°C (10 min); temperatura do injector: 290°C; temperatura da linha de transferência: 290°C; razão de split: 1/75 [43].

2.11. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

As amostras de folhelho, lenhina e pasta, foram analisadas sob a forma de pastilha, por prensagem das amostras em pó com KBr. Os espectros foram realizados no modo transmitância, com uma resolução de 4cm⁻¹ e 64 scans/min num espectrofotómetro MATTSON 7000 com Transformada de Fourier.

2.12. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C CP/MAS

Os espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C da matéria-prima, da lenhina e da pasta, foram adquiridos a 100,6 MHz (9,4 T) num espectrómetro MSL-400 da Bruker. As amostras foram empacotadas em rotores de 7 mm que rodaram segundo o ângulo mágico a uma frequência de 5,0 KHz. A duração do impulso de 90° foi de cerca de 4 μs . O tempo de contacto escolhido para a polarização cruzada foi de 2 ms e o intervalo entre scans foi de 5 s.

2.13. Espectroscopia de RMN de ^1H

Uma alíquota de substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol foi dissolvida em D_2O e o espectro de próton foi adquirido a 60°C num espectrómetro Bruker AMX 300 a 300,13 MHz utilizando as seguintes condições: tempo de relaxação 10,2 μs , pulso de 90° , 400 scans e intervalos de 12 s entre os scans. Os desvios químicos foram referenciados relativamente ao 3-(trimetilsilil)propionato-d4 de sódio ($\delta = 0,00$).

2.14. Espectroscopia de RMN ^1H - ^1H (TOCSY)

O espectro de 2D de ^1H - ^1H TOCSY ($\tau_{\text{mix}} = 0,050$ s) das substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol foi obtido no mesmo espectrómetro referido na secção 2.13 usando o programa MLEVST. Para a espectroscopia de 2D de ^1H - ^1H TOCSY foi utilizada em ambas as dimensões uma largura espectral de 2185 Hz e um tempo de relaxação de 1,5 segundos. Para cada FID foram adquiridos 128 transitórios, o tamanho da matriz de dados foi de 1024 em t_1 por 512 em t_2 .

2.15. Cromatografia de Permeação em Gel – GPC

Os pesos moleculares médios das substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol e dos extractáveis em diclorometano da pasta foram determinados por GPC.

A análise por GPC de substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol foi realizada em duas colunas Plaguagel-OH MIXED 8 μm , $300 \times 7,5$ mm acopladas a um aparelho PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories Ltd., U.K.) com um detector de índice de refração. O injector e as colunas foram mantidos a 36°C de modo a diminuir a viscosidade do solvente e o alargamento do pico. Foi utilizada água ultrapura (J.T. Baker Chem.Co.) contendo NaNO_3 (0,1 M) e NaN_3 (0,02%), como fase móvel, com um fluxo de 0,9 mL/min. Foi injectado um volume de 100 μL de amostra com a concentração de

0,4-0,5% mg/mL. A coluna analítica foi calibrada com polímeros padrão (pululana, Polymer Laboratories) no intervalo de massas de 0,8 – 48 kDa. Obteve-se a seguinte curva de calibração: $\log M = 14,68 - 0,5564 t$.

As substâncias extractáveis foram dissolvidas num pequeno volume de clorofórmio até uma concentração de cerca de 6 mg/mL. A análise por GPC foi realizada no mesmo aparelho referido anteriormente, mas usando duas colunas TOSOH 300×7 mm. As colunas, o sistema de injeção e o detector foram mantidos a 40°C durante a análise. A velocidade de fluxo do eluente (clorofórmio) foi de 0,7 mL/min. A coluna analítica foi calibrada com polímeros padrão (PS, Polymer Laboratories) no intervalo de massas de 580 – 7000 Da.

2.16. Difracção de Raios-X

O ensaio foi realizado à temperatura ambiente num difractómetro Philips X'Pert MPD, usando uma fonte de Cu-K α ($\lambda=0.154$ nm) numa gama de 2θ entre 2-40° e um varrimento de 0,02°/scan. O difractograma de raios-X foi obtido directamente a partir de uma amostra de celulose previamente prensada em forma de pastilha.

O grau de cristalinidade (DC_0) das fibras de celulose foi determinado pela comparação entre a magnitude relativa e a difracção total das fases amorfas e cristalinas, após separação das mesmas (equação 17) [44].

$$DC_o (\%) = \frac{I_{cr}}{I_{cr} + I_{am}} \times 100 \quad 17$$

Onde, I_{cr} é a intensidade máxima do plano de difracção 002 ($2\theta = 22^\circ$) cuja reflexão é atribuída à região cristalina da celulose e I_{am} é a intensidade de difracção a $2\theta = 18^\circ$, cuja reflexão é atribuída à região amorfa da celulose.

Tendo em conta a existência de componentes não-celulósicos, o valor de DC_0 teve de ser corrigido e assim calculou-se o grau de cristalinidade (DC) a partir da equação 18.

$$DC(\%) = DC_o \times \left[1 + 0,3 \times \left(\frac{1}{w} - 1 \right) \right] \quad 18$$

em que, w é a proporção relativa de celulose, que neste caso é de 0,95.

Pela equação de Scherer (equação 19), determinou-se a largura média de cristalito no plano de rede 002, d_{002} [44].

$$d_{002} = \left[\left(\frac{\beta_{002} \times \cos \theta_{002}}{\lambda} \right)^2 - \left(\frac{\delta_L}{d_L} \right) \right]^{-1/2} \quad 19$$

Onde, β_{002} corresponde ao valor (em radianos) da largura a meia altura da reflexão do plano 002; θ_{002} é o máximo da reflexão do plano 002; λ é o comprimento de onda usado pela fonte de raios-X (0,0154 nm); δ_L é um parâmetro relacionado com a distorção da rede perpendicular à direcção do plano 002 (0,05) e d_L representa um parâmetro relacionado com a distância entre os planos de rede 002 (0,395 nm).

A altura média de um cristalito, c , pode ser determinada pela análise do reflexo do plano 040 e aplicando a Lei de Bragg (equação 20).

$$n\lambda = 2d \times \text{sen} \theta_{040} \quad 20$$

em que n representa a ordem do feixe difractado, d o espaçamento entre os planos de difracção e θ_{040} o ângulo correspondente ao reflexo do plano 040.

Sabendo que numa célula unitária de celulose nativa se podem identificar quatro secções originadas pelo plano 040, a altura média de cristalito é dada pela equação 21.

$$c = 4 \times d \quad 21$$

3. OBTENÇÃO DE PASTAS DE FOLHELHO DE UVA

Foram realizados vários ensaios, com diferentes tratamentos, para a obtenção de pastas a partir de folhelho de uva.

3.1. Cozimento Kraft

O cozimento da amostra de folhelho (2 g) foi realizado a 160°C, durante 1h40, com uma solução de licor branco com 18% de alcali activo (A.A), 28% de índice de sulfureto (S) e hidromódulo de 6,25. O volume de solução no reactor foi de 12,5 mL. No final da reacção lavou-se a pasta com sucessivas adições de água destilada (sob vácuo), até se obter a neutralidade do filtrado. A pasta foi conservada à temperatura ambiente após ser-lhe retirada toda a humidade.

3.2. Tratamento com Ácido Peracético

Num reactor de vidro (250 mL) com controlo de temperatura e agitação mecânica, foram adicionadas 5 g de folhelho a 40 mL de ácido peracético (AP) a 5%. Ao fim de 20 minutos, à temperatura de 80 °C, foram adicionados mais 40 mL de AP com metade da concentração e submeteu-se novamente a mistura à temperatura de 80 °C, durante mais 10 minutos. A pasta resultante foi filtrada sob vácuo e lavada, sucessivas vezes, com água

destilada e acetona até à sua neutralidade. Por fim, a pasta foi guardada no frigorífico (+4°C), para posteriores análises.

3.3. Tratamento com Peróxido de Hidrogénio e Molibdato de Amónio

A uma solução de H₂O₂ a 5% adicionaram-se 70 mg de molibdato de amónio. Aferiu-se o pH até 5 e a 50 mL de solução adicionaram-se 5 g de folhelho. A reacção ocorreu durante 1h a 80°C sob agitação mecânica. De seguida procedeu-se ao branqueamento da amostra no mesmo reactor, por tratamento com ácido peracético em 2 estágios. O 1º estágio decorreu durante 15 minutos utilizando uma concentração de AP igual a 6,68 %, no segundo estágio a concentração de AP utilizada foi de 3% e a reacção ocorreu também durante 15 minutos. A pasta resultante foi filtrada sob vácuo e lavada, sucessivas vezes, com água destilada e acetona até à sua neutralidade.

4. ANÁLISE DE PASTAS

4.1. Viscosidade Intrínseca

O estudo da viscosidade foi efectuado de acordo com o procedimento SCAN-CM 15:88 [45], que permite calcular a viscosidade intrínseca de pastas através da sua dissolução numa solução diluída de cupri-etilenodiamina (CED).

A viscosidade relativa (η_{rel}) foi calculada a partir da determinação do tempo de escoamento (t_e), pela equação 22.

$$\eta_{rel} = h \times t_n \quad 22$$

em que, h representa a constante do viscosímetro.

Conhecendo o valor de η_{rel} obtêm-se o valor do produto da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) pela concentração da pasta (c), através dos valores tabelados no procedimento SCAN-CM 15:88. Por fim, a partir da equação de Martin (equação 23), determinou-se a $[\eta]$ [45].

$$\log \frac{\eta_{rel} - 1}{c} = \log[\eta] + K[\eta]c \quad 23$$

em que, K é uma constante e vale 0,13.

4.2. Histograma de Fibras

O histograma de fibras foi efectuado num aparelho Fiber Quality Analyser (OpTest, Canada) no Instituto de Investigação da Floresta e do Papel – Raiz.

4.3. Medição de Ângulos de Contacto

Os ângulos de contacto, da superfície da pasta seca, foram medidos pelo método da gota sésil, para três reagentes de teste (água, formamida e diiodometano), num aparelho Surface Energy Evaluation System. A equação do modelo de Owens-Wendt (equação 24) foi utilizada para o cálculo das componentes polar (γ_s^P) e dispersiva (γ_s^d) da energia de superfície da pasta [46,47].

$$\left(\frac{1 + \cos(\theta)}{2}\right) \times \left(\frac{\gamma_i^P + \gamma_i^d}{\sqrt{\gamma_i^d}}\right) = \sqrt{\gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_s^P} \times \sqrt{\frac{\gamma_i^P}{\gamma_i^d}} \quad 24$$

Pela medição dos ângulos de contacto (θ) e sabendo as componentes polar (γ_i^P) e dispersiva (γ_i^d) das tensões superficiais de cada líquido (Tabela 7), fez-se um ajuste aos pontos da melhor recta a partir do gráfico de $y \left(\left[\frac{(1 + \cos(\theta))}{2} \right] \times \left[\frac{(\gamma_i^P + \gamma_i^d)}{\sqrt{\gamma_i^d}} \right] \right)$ em função de $x \left(\sqrt{\frac{\gamma_i^P}{\gamma_i^d}} \right)$ e a partir do declive e da ordenada na origem determinam-se γ_s^P e γ_s^d , respectivamente.

Tabela 7: Componentes das tensões superficiais de cada líquido utilizado.

Líquidos	Água	Formamida	Diiodometano
γ_i^P	51,0	19,0	0
γ_i^d	21,8	39,0	50,8

4.4. Análise Térmica

Amostras de pasta e dos seus extractos em diclorometano foram sujeitas a análises térmicas por análise termogravimétrica (TGA) e por calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

4.4.1. TGA

A análise térmica foi efectuada utilizando cerca de 6 mg de amostra, colocada num porta-amostras de platina. Para a aquisição do termograma utilizaram-se as seguintes condições: velocidade de aquecimento 10°C/min, intervalo de temperaturas 25 °C a 600°C, atmosfera de N₂, fluxo de 20 mL/min, num equipamento Shimadzu TGA-50.

4.4.2. DSC

Transferiu-se uma massa de cerca de 5 mg de amostra para um porta-amostras de alumínio tendo sido utilizadas as seguintes condições de análise: atmosfera de N₂, fluxo de 20 mL/min, velocidade de aquecimento 10 °C/min num aparelho Shimadzu DSC-50, intervalo de temperaturas 25 °C a 300 °C.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ANÁLISE QUÍMICA DO FOLHELHO

De modo a analisar o folhelho de uva procedeu-se ao estudo da sua composição química, nomeadamente pela determinação dos teores de cinzas, extractáveis em acetona, diclorometano e água, proteínas, taninos, resíduo insolúvel em H₂SO₄ a 72 %, celulose *Kürschner* e *Höffer* e hemiceluloses, em base de massa seca (Tabela 8). Numa posterior abordagem, foi efectuada uma caracterização dos componentes utilizando diversas técnicas, como: FTIR, RMN ¹³C de CP/MAS, DRX, RMN de ¹H, RMN de ¹H-¹H (TOCSY) de correlação, GPC e GC-MS.

Tabela 8: Composição química do folhelho de uva.

Parâmetros	Teor (%)
Cinzas (sais de K, Ca e Mg)	7,8
Extractáveis	
Acetona	5,7
Diclorometano	5,5
Água	26,4
Proteínas	18,8
Taninos	13,8
Resíduo insolúvel em H ₂ SO ₄ a 72 %	22,4
Celulose <i>Kürschner</i> e <i>Höffer</i>	20,8
Hemiceluloses [#]	24,9

[#] o valor inclui as substâncias pécticas

O folhelho foi extraído com diferentes solventes (acetona, diclorometano, água) com o objectivo de quantificar compostos de baixo peso molecular com diferentes polaridades. Nos extractáveis em água, poderá estar contabilizada uma fracção de hidratos de carbono. Pela análise elementar das cinzas verificou-se que o folhelho é, em termos de conteúdos catiónicos, essencialmente constituído por potássio (9140,7 mg/kg folhelho), cálcio (360,2 mg/kg de folhelho) e magnésio (79,7 mg/kg de folhelho).

É de referir que o folhelho de uva tem mais de 50% de matéria polimérica insolúvel em água e solventes orgânicos (celulose e hemiceluloses), o que leva a propor a possível

utilização destes polissacarídeos em novas aplicações (como fonte de fibra para biocompósitos ou papel). É porem necessário fazer-se uma análise exaustiva destes componentes para se puder sugerir alguma aplicação prática.

1.1. Caracterização Estrutural do Folhelho

O folhelho de uva foi caracterizado estruturalmente por espectroscopia de FTIR e por RMN ¹³C do estado sólido. Na Figura 19, visualiza-se o espectro de FTIR do folhelho.

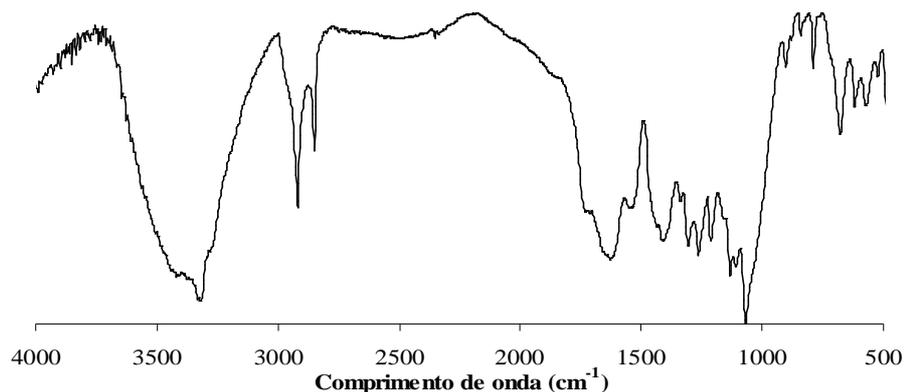


Figura 19: Espectro de FTIR do folhelho.

Na Tabela 9 apresentam-se os grupos funcionais e as atribuições correspondentes.

Tabela 9: Freqüências vibracionais e tipos de vibração.

Freqüência (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Atribuição
3320	v OH	Extractáveis, polissacarídeos, lenhina
2917	va CH (CH ₂ alifática)	Extractáveis, polissacarídeos, lenhina
2850	vs CH (CH ₂ alifática)	Extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1729	N C=O (ésteres)	Extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1643	v C=C (aromático)	Extractáveis, lenhina
1550	v C=C (aromático)	Extractáveis, lenhina
1436	δ CH	Extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1338	δ OH	extractáveis, polissacarídeos
1307	v C- O	Polissacarídeos
1263	v C- O	Polissacarídeos
1213	v C- O	Polissacarídeos
1159	va C-O	Extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1133	v C- O	Polissacarídeos
1108	δ CH, C-O	polissacarídeos, lenhina
1068	δ CH, C-O	polissacarídeos, lenhina
904	δ C-H	Polissacarídeos

Sendo v a vibração por alongação (va: assimétrica, vs: simétrica) e δ a vibração por deformação.

Na Figura 20, apresenta-se o espectro de RMN ^{13}C de CP/MAS do folhelho e na Tabela 10 os sinais correspondentes.

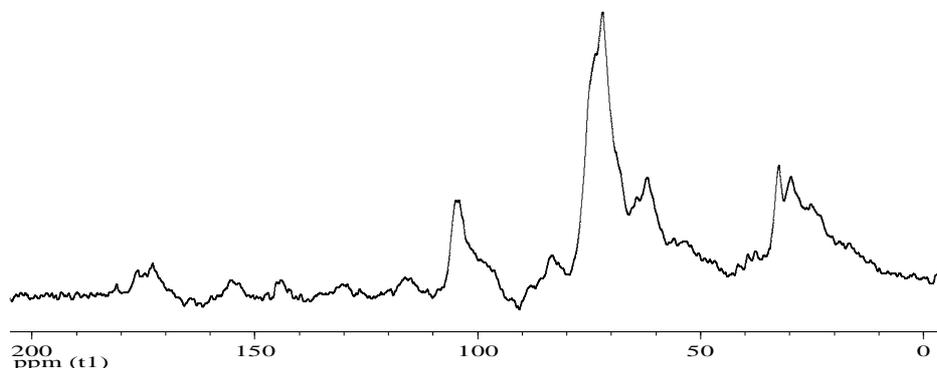


Figura 20: Espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C do folhelho.

Tabela 10: Sinais de RMN CP/MAS de ^{13}C .

Desvio químico (ppm)	Atribuição
24-54	-(CH ₂) _n -, extractáveis, cutina
56	- (OCH ₃)-, hemiceluloses
62-64	C6, celulose e hemiceluloses
72-74	C2, C3, C5, celulose e hemiceluloses
83,4	C4, celulose e hemiceluloses
105	C1, celulose e hemiceluloses
145	C quaternário, extractáveis (taninos)
173	-COO-R, CH ₃ -COO-, hemiceluloses
177	-COOH, hemiceluloses (ácidos urónicos), compostos fenólicos

No espectro de FTIR da Figura 19, verifica-se a presença dos dois picos muito intensos a 2917 e 2850 cm^{-1} e uma banda a 1729 cm^{-1} , que sugerem a presença de compostos alifáticos com funcionalidades carboxílo/éster, tais como extractáveis e/ou compostos poliméricos do tipo cutina. Esta observação é confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C (Figura 20) pela presença de sinais característicos na região alifática (24-54 ppm) e na região correspondente aos grupo carbonilo (170-180 ppm). Os sinais entre 160-180 ppm podem ser atribuídos a grupos éster alifáticos presentes em compostos como a cutina, o sinal a 177 ppm indica a presença de grupos carboxilos de ácidos urónicos [48-53].

As bandas a 1640-1430 cm^{-1} são atribuídas à lenhina, no entanto as bandas nesta região estão pouco definidas e não são típicas deste composto, no entanto dentro do mesmo intervalo destaca-se a presença de compostos fenólicos (1300-1460 cm^{-1}), como os taninos.

A presença de compostos aromáticos, do tipo taninos, pode ainda ser confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C , uma vez que também não se verificam picos típicos de compostos aromáticos na região correspondente (100-160 ppm) do espectro [54-56].

Os polissacarídeos são os componentes maioritários do folhelho, este facto é verificado pela análise dos espectros de FTIR ($1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$) e de RMN de ^{13}C no estado sólido (60-105 ppm) [48-53].

1.2. Resíduo Insolúvel em H_2SO_4 a 72 %

A partir da análise de lenhina pelo método klason, pretende-se isolar a lenhina como resíduo insolúvel. O resíduo obtido pelo tratamento do folhelho com H_2SO_4 a 72 %, foi analisado por FTIR e por RMN ^{13}C de CP/MAS [54-56].

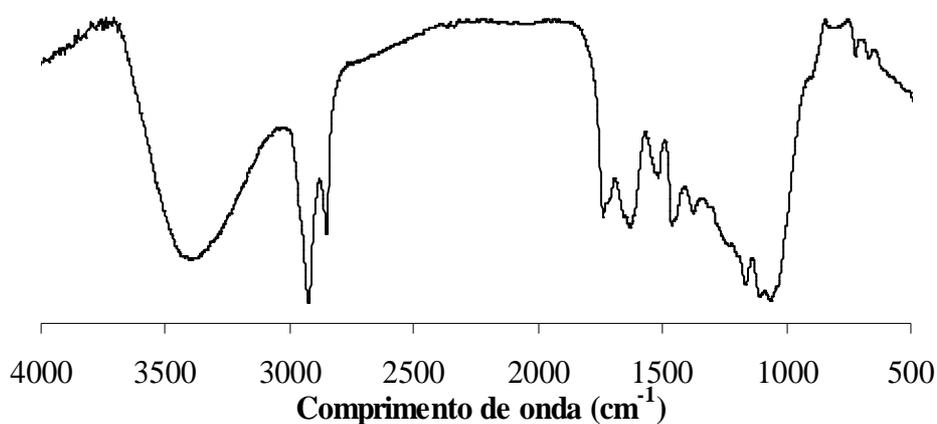


Figura 21: Espectro de FTIR do resíduo insolúvel em H_2SO_4 a 72 %.

As bandas na região $1600\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$, visualizadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 21, encontram-se pouco definidas, sendo muito diferentes das bandas relativas à lenhina nesta região do espectro. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 22) também não se verificam os picos típicos de lenhina na região correspondente (110-160 ppm) do espectro.

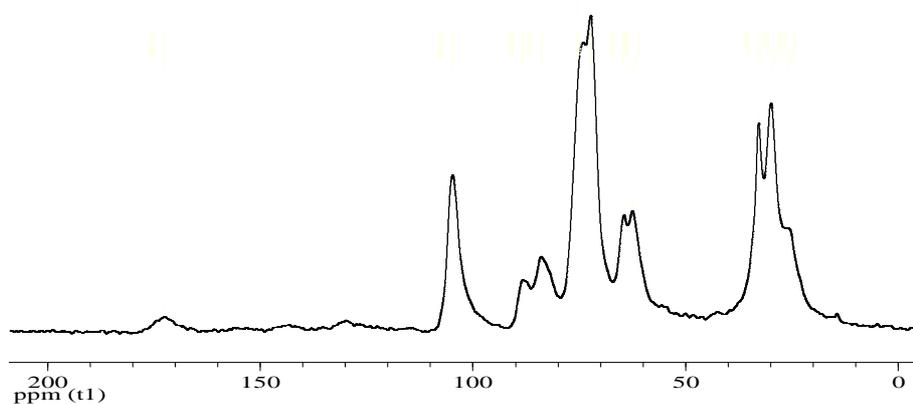


Figura 22: Espectros de RMN sólido do resíduo insolúvel em H_2SO_4 a 72 %.

Assim pode-se concluir a não existência de lenhina no folhelho, uma vez que não se observam os grupos funcionais típicos da lenhina, referenciados na literatura [54-56].

1.3. Polissacarídeos

De modo a caracterizar a fracção polissacarídica do folhelho procedeu-se à análise dos açúcares neutros, mediu-se o grau de cristalinidade da celulose por DRX e posteriormente analisaram-se as hemiceluloses por análise dos açúcares neutros e através das técnicas de GPC, de RMN de ^1H e de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (TOCSY).

1.3.1. Açúcares Neutros

Analisando a Tabela 11, verifica-se que os açúcares predominantes no folhelho são a glucose, a manose, a arabinose e a xilose. O que permite concluir que o folhelho além de ser constituído por celulose, também é composto por mananas, arabinanas, xilanas e xiloglucanas.

Tabela 11: Composição média em monossacarídeos do folhelho de uva.

Açúcares	Composição % (m/m_{total})
Ramnose	2,5
Fucose	0,5
Arabinose	10,2
Xilose	9,6
Manose	10,8
Galactose	5,3
Glucose	61,1

% (m/m_{total}): razão mássica entre cada monossacarídeo e o total de monossacarídeos.

1.3.2. Celulose

A técnica de difracção de raios-X foi efectuada de modo a comprovar a existência de celulose e analisar os reflexos típicos 002, 101 e 101'.

Pela identificação dos reflexos dos diferentes planos e dos domínios amorfos e cristalinos (Figura 23) confirma-se a presença de celulose e verifica-se que o grau de cristalinidade da celulose (DC) é de 66,1 %. A largura média de cristalito no plano 002

(d_{002}) é de 3,7 nm e a altura média de um cristalito (c) é de 1,03 nm. Os máximos dos reflexos dos planos 002 e 101 e 101' (sobrepostos) correspondem a $22,02^\circ$ e $15,36^\circ$, respectivamente, que são concordantes com os valores da literatura para a celulose I [44,57,58].

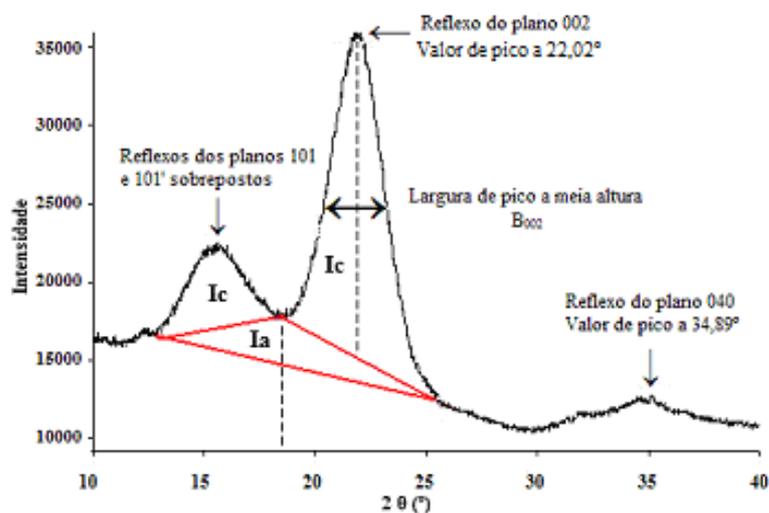


Figura 23: Difractograma de Raios-X da celulose.

1.3.3. Hemiceluloses

A caracterização das hemiceluloses solúveis em água foi efectuada pela análise de substâncias solúveis em água quente e precipitadas em etanol (SSP), utilizando GPC, GC-FID, RMN de ^1H e RMN $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (TOCSY) de correlação total.

A distribuição do peso molecular das SSP foi analisada por GPC. Na curva de eluição, representada na Figura 24, verifica-se uma distribuição bimodal. O peso molecular do pico (M_p) da 1ª fracção eluída, entre 14,0 e 19,6 minutos, foi de 33100 Da e o M_p da 2ª fracção eluída, entre os 19,6 e os 25,0 minutos, foi igual a 2900 Da.

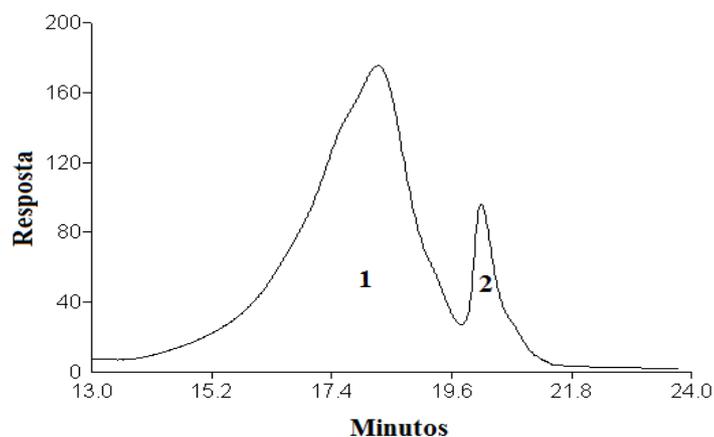


Figura 24: Curva de eluição das SSP.

Os pesos moleculares médios: ponderado, M_w e em número, M_n , e a polidispersividade, M_w/M_n , foram determinados nos mesmos tempos de eluição calculadas isoladamente para cada fracção estando apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: M_w , M_n e a M_w/M_n das substâncias isoladas em água quente e precipitadas em etanol.

Picos	M_w (Da)	M_n (Da)	M_w/M_n (Da)
1	91406	34291	2,66
2	2550	2400	1,1

Pela análise destes dados, conclui-se que a fracção 1 corresponde a uma fracção polissacarídica com um M_w mais elevado ou com uma estrutura mais ramificada, relativamente à 2ª fracção, que leva a um volume hidrodinâmico mais elevado.

Pela análise dos açúcares neutros verifica-se que os açúcares constituintes deste polissacarídeo são a manose, a glucose, a arabinose e a galactose, com pequenas quantidades de ramnose, xilose e fucose (Tabela 13).

Tabela 13: Açúcares neutros existentes nas substâncias isoladas em água quente e precipitadas em etanol.

Açúcares	Composição (% m/m)
Manose	33,1
Glucose	24,7
Arabinose	17,7
Galactose	16,5
Ramnose	3,6
Xilose	3,2
Fucose	1,2

De modo a serem analisadas as características gerais deste composto foram adquiridos espectros de RMN de ^1H e RMN de correlação ^1H - ^1H (TOCSY). Os picos das unidades glicosídicas foram assinalados com base em dados da literatura [59-61] e estão apresentados directamente no espectro de RMN de protão de ^1H da Figura 25.

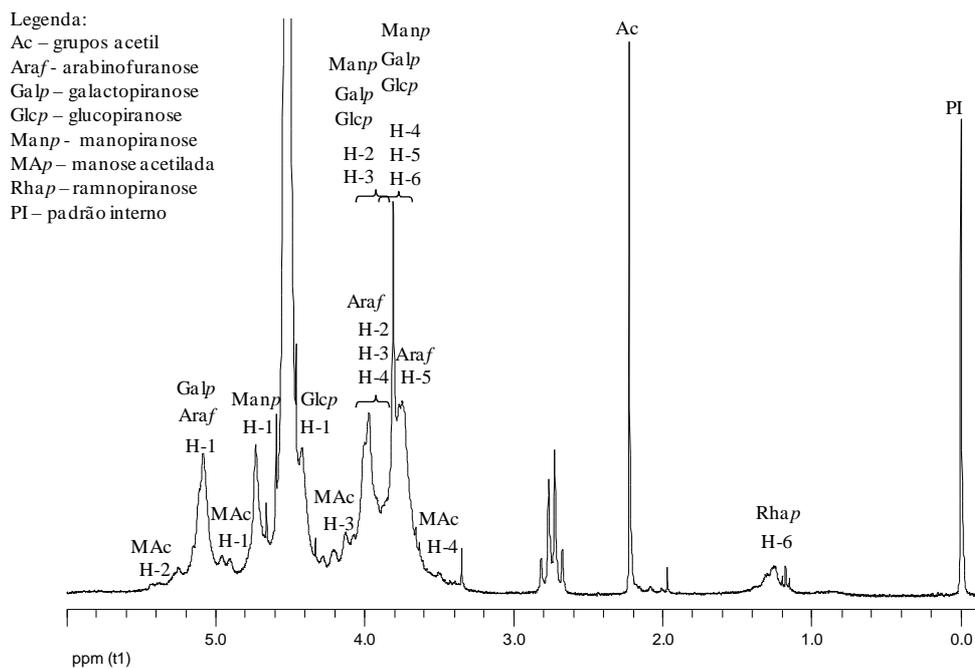


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H das SST.

Através da espectroscopia de próton correlacional (TOCSY), cujo espectro está representado na Figura 26, foi proposto que a cadeia principal deste polissacarídeo deveria ser constituída por unidades de anidro β -D-manopiranoose e unidades de anidro β -D-glucopiranoose ligadas entre si por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), o que se confirma pelas atribuições de sinais apresentadas no espectro da Figura 25.

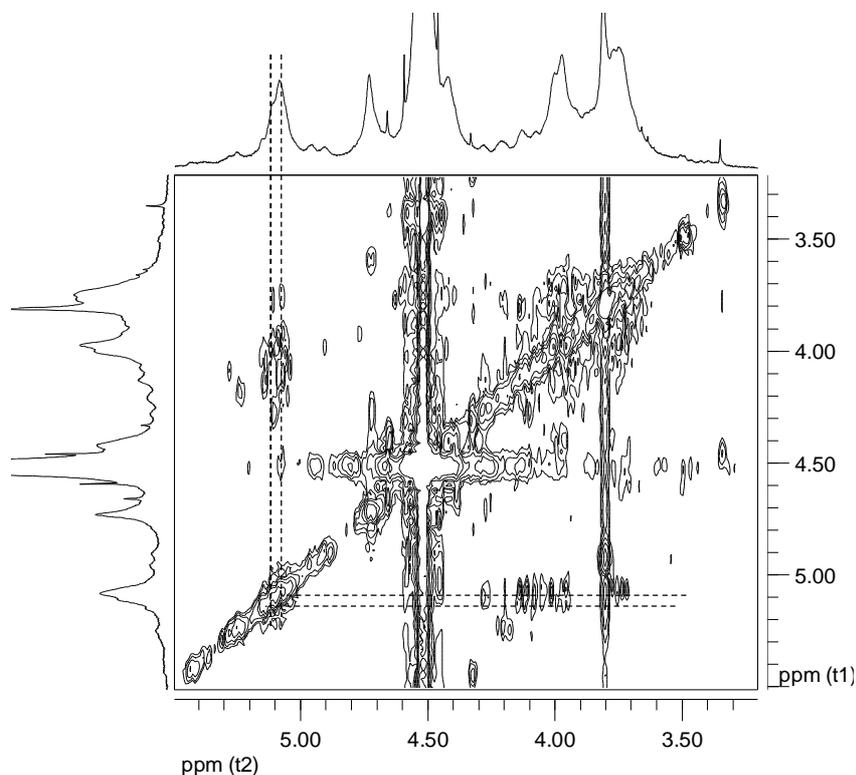


Figura 26: Espectro de RMN de correlação ^1H - ^1H (TOCSY) das SSP.

Esta cadeia polissacarídica poderá estar ramificada com resíduos de galactose e arabinose. Algumas unidades de manose na cadeia apresentam grupos acetilo na posição C-2. No entanto, devido à complexidade deste polissacarídeo foi difícil elaborar a sua estrutura exacta. Para tal será necessário efectuar estudos mais detalhados, como o estudo estrutural depois do isolamento das fracções polissacarídicas por GPC ou outras técnicas de separação, também se poderá efectuar a hidrólise enzimática parcial seguida de análise estrutural. Além disso, também se pode estar perante uma mistura de vários polissacarídeos, uma vez que poderão estar presentes glucomananas e ramnoarabinogalactanas simultaneamente. É de referir que as ramnoarabinogalactanas são constituintes de compostos pécticos e as glucomananas são hemiceluloses típicas dos frutos.

2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PASTAS

O folhelho de uva foi sujeito a vários tratamentos, o cozimento kraft e o tratamento organosolv com ácido peracético, de modo a possibilitar a sua transformação em pastas

2.1. Cozimento kraft

Para o cozimento kraft, cerca de 2 gramas de folhelho de uva foram sujeitas às condições de análise descritas na Tabela 14.

Tabela 14: Condições de análise do cozimento kraft.

T (°C)	Tempo	AA (%)	S (%)	Hidromódulo (razão perácido:matéria-prima)
160	1h40	18	28	6,0

Após o cozimento, obteve-se uma matéria preta, em que se notavam as películas da uva praticamente inalteradas, como se pode observar pela Figura 27. Embora o cozimento tenha apresentado um rendimento na ordem dos 33 %, a amostra obtida seria de difícil utilização, para quaisquer fins.



Figura 27: Resíduo resultante do cozimento kraft do folhelho.

Uma vez que a tentativa de obtenção de pastas a partir do cozimento kraft não apresentou resultados satisfatórios, decidiu-se proceder a um tratamento organosolv com ácido peracético.

2.2. Tratamento com Ácido Peracético

Na preparação do ácido peracético, foi adicionada a mesma quantidade de volume de anidrido acético e de peróxido de hidrogénio, obtendo-se o ácido peracético para o tratamento organosolv. É de referir que o ácido peracético tem uma pequena proporção de H_2O_2 livre (1,45 %).

Neste tratamento, procedeu-se a amostra a dois estágios, o primeiro de modo à ocorrência de reacções de oxidação dos compostos aromáticos e o segundo para um branqueamento da pasta obtida, como se visualiza na Figura 28.

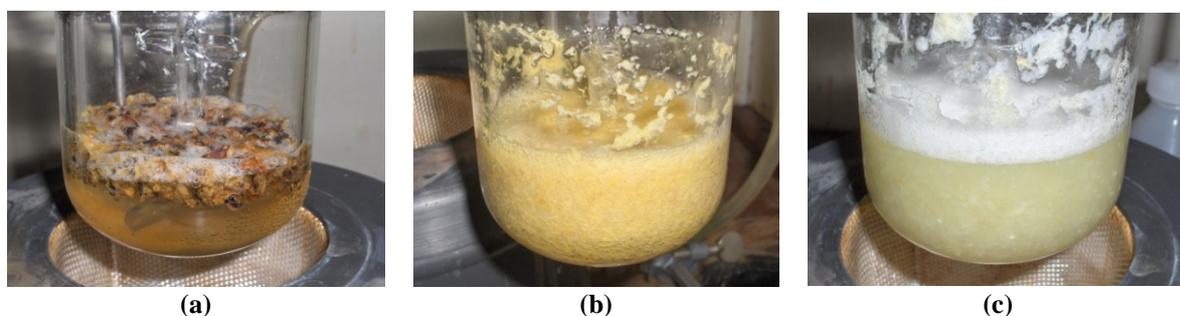


Figura 28: Fases do tratamento AP: (a) início (b) após 1º estágio e (c) fim do tratamento.

Após filtração e lavagem, foi obtida uma película de pasta de aspecto ceroso (Figura 29).



Figura 29: Película de pasta.

Ao longo de todo este trabalho, as condições do processo foram alteradas com vista à optimização deste tratamento. Tais como: a temperatura, o tempo de tratamento, a concentração de perácido e a carga de pasta (hidromódulo), mantendo o pH igual a 4. Na Tabela 15, apresentam-se algumas das condições usadas no tratamento AP efectuado ao folhelho de uva.

Tabela 15: Condições de análise do tratamento com ácido peracético.

Ensaio	Estágio	m _{folhelho} (g)	[AP] (%)	Hidromódulo	Tempo (min.)	m _{pasta} (g)	Rendimento (%)
1	1°	4,8770	4,7	38,52	25	2,1018	43,1
	2°		2,4	19,26	15		
2	1°	4,9424	5,5	44,60	20	2,2970	46,5
	2°		2,8	22,30	10		
3	1°	5,0319	8,8	69,70	20	1,9270	38,3
	2°		4,4	34,85	10		

No tratamento que permitiu obter um maior rendimento (46,5%) utilizou-se uma concentração de AP de 5,5 % no 1° estágio e no segundo de 2,8 %. O segundo estágio funciona como branqueamento e não são necessárias concentrações tão elevadas como no 1° estágio.

2.3. Tratamento com Peróxido de Hidrogénio e Molibdato de Amónio

No tratamento com H₂O₂ e molibdato de amónio como catalisador submeteu-se a amostra de folhelho a um cozimento seguido de branqueamento com ácido peracético. No cozimento, a amostra (5g) foi tratada durante 1 hora, a pH igual a 5 com 50 mL H₂O₂ (5%) e molibdato de amónio (0,15%), com controlo de agitação e de temperatura (80 °C). Uma vez que a pasta obtida apresentou uma coloração muito escura, foi necessário proceder ao branqueamento da mesma com ácido peracético. De modo a obter-se um branqueamento eficaz foi necessário submeter-se a pasta resultante do tratamento com H₂O₂ e molibdato de amónio a 2 estágios, em que no 1° foi utilizada uma concentração de AP (6,68%) duas vezes superior ao 2° estágio. O rendimento obtido neste tratamento foi cerca de 33 %.

O tratamento do folhelho apenas com ácido peracético apresentou-se como o tratamento mais viável, económica e ambientalmente, para a obtenção de pastas a partir do folhelho.

As vantagens do tratamento AP em relação aos outros tratamentos são notórias não só pela menor quantidade de reagentes necessários (reagentes estes menos poluentes que os utilizados nos outros tipos de tratamento) como também por se utilizarem temperaturas mais baixas e menores tempos de reacção.

2.4. Análise Química da Pasta

O folhelho submetido a um tratamento organosolv com ácido peracético foi submetido a várias análises. A pasta obtida foi caracterizada quanto à sua análise química, foi feita a determinação da estrutura da cutina, determinou-se a viscosidade intrínseca, analisou-se a dimensão das suas fibras, determinaram-se os ângulos de contacto e a energia de superfície da película da pasta e efectuaram-se análises por TGA e por DSC, comparando a pasta com os seus extractáveis.

2.4.1. Caracterização Estrutural

A pasta de folhelho foi caracterizada por FTIR e por RMN ^{13}C de CP/MAS e comparada com o folhelho, sendo possível verificar algumas diferenças [48-56].

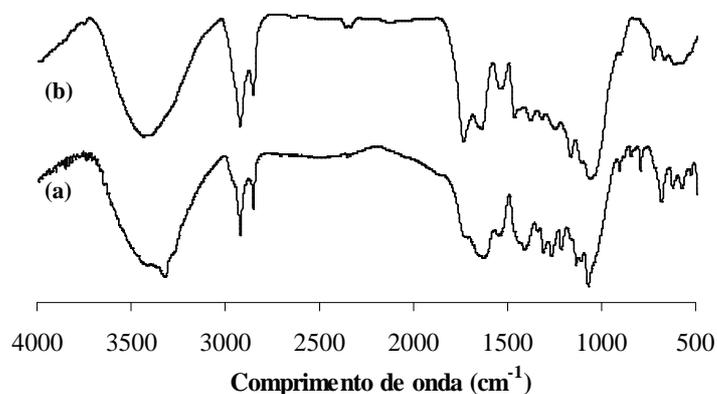


Figura 30: Espectros de FTIR de (a) folhelho de uva e (b) pasta.

Pela análise do espectro de FTIR (Figura 30) da pasta, verifica-se que houve uma diminuição da intensidade de sinais atribuídos aos extractáveis e aos polissacarídeos, na região 1600-1200 ppm. Facto que sugere uma degradação desses compostos aquando da preparação da pasta. No entanto, observam-se, ainda na região referida, sinais atribuídos a compostos alifáticos, embora em pequena quantidade, e nomeadamente um aumento de intensidade dos sinais a 1730 e 1550 ppm, que indicam que a degradação destes compostos não foi completa e/ou que estes se encontram ligados covalentemente aos componentes estruturais, tal como sucede com os compostos poliméricos do tipo cutina. Estas observações são confirmadas pela análise dos espectros de RMN (Figura 31).

No espectro de RMN (Figura 31), relativo à pasta, verificou-se uma degradação dos taninos (110-160 ppm), dos ácidos urónicos e das substâncias pécticas (45-50 ppm e 95-100 ppm) aquando do tratamento oxidativo, concluindo-se que estes não estão presentes

na pasta. Verifica-se um aumento da fracção alifática (24-54 ppm) e das fracções relativas aos hidratos de carbono (60-105 ppm) da celulose e das hemiceluloses.

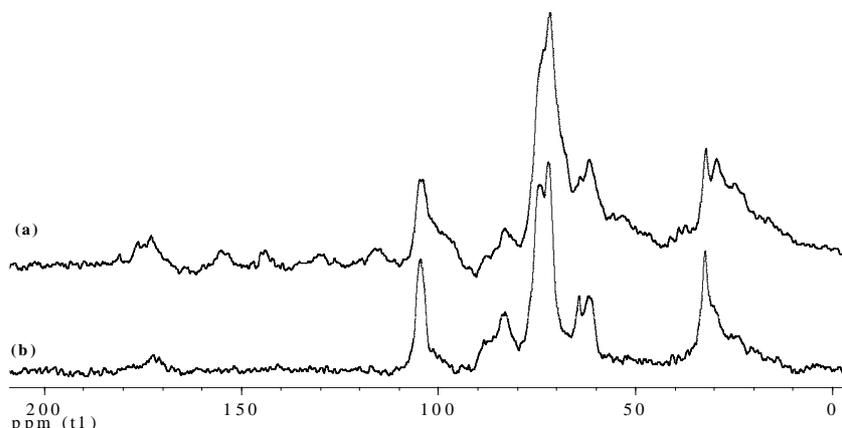


Figura 31: Espectros de RMN ¹³C de CP/MAS (a) folhelho de uva e (b) pasta.

Assim, comparando os espectros de FTIR (Figura 30) e de RMN (Figura 31) da pasta comprova-se o facto de esta ser constituída maioritariamente por celulose e cutina, o que também se confirma pela análise dos açúcares neutros descrita abaixo.

2.4.2. Açúcares Neutros

Na Tabela 16, é feita a comparação entre os açúcares existentes no folhelho e os existentes na pasta em % (m/m_t) (razão mássica entre cada monossacarídeo e o total de monossacarídeos). Pela análise da tabela, verifica-se uma diminuição dos teores de ramnose e de arabinose para quantidades vestigiais. Nota-se também um decréscimo da composição de manose. Estas alterações evidentes em relação ao folhelho, revelam que aquando da preparação da pasta ocorreu uma degradação dos materiais extractáveis e/ou das hemiceluloses e de outros resíduos, concluindo-se que a pasta é essencialmente constituída por celulose e polímeros do tipo xilanas.

Tabela 16: Composição média em monossacarídeos da pasta relativamente ao folhelho de uva.

Açúcares	Composição % (m/m _t)	
	Folhelho	Pasta
Ramnose	2,5	0,7
Fucose	0,5	0,7
Arabinose	10,2	0,9
Xilose	9,6	12,3
Manose	10,8	5,1
Galactose	5,3	5,3
Glucose	61,1	75,0

2.4.3. Caracterização da cutina

A cutina, substância associada à pasta, foi isolada através da extracção da pasta em diclorometano e caracterizada quanto à distribuição da sua massa molecular e à identificação dos seus compostos livres e esterificados, de forma a obter a sua possível estrutura.

2.4.3.1. Distribuição do peso molecular dos extractos

A distribuição do peso molecular dos extractáveis mostra o carácter multimodal da amostra. De acordo com a calibração da coluna com padrões de poliestireno, os compostos com tempo de retenção superior a 17,3 minutos podem ser atribuídos aos monómeros constituintes da cutina, os compostos eluídos antes são de origem polimérica.

Sendo assim, na curva de eluição dos extractáveis da pasta (Figura 32), efectuou-se uma 1ª integração da curva entre os 12 e os 17,3 minutos, que corresponde a 72 % da área total. A 2ª integração ocorreu após os 17,3 minutos com uma área de 28 %.

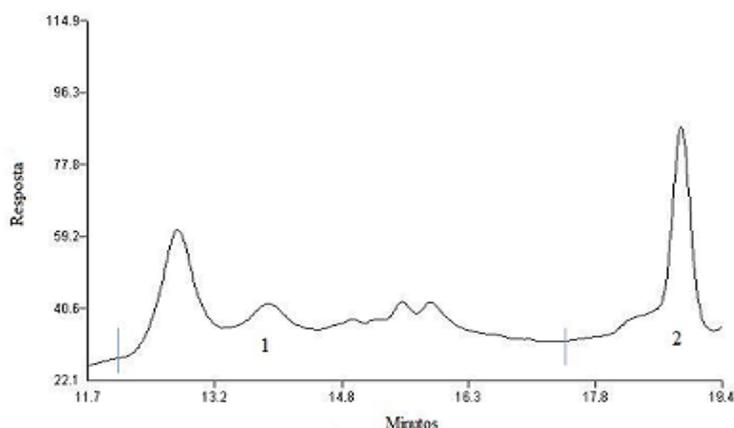


Figura 32: Curva de eluição dos extractáveis da pasta.

Ambas as fracções foram analisadas quanto aos pesos moleculares médios. A fracção polimérica (tempo de retenção entre os 12 e os 17,3 minutos) apresentou um valor de M_w igual a 3600 Da e M_n igual a 2350 Da e a fracção monómerica (tempo de retenção entre os 17,3 e os 19,4 minutos) um M_w igual a 240 Da e M_n igual a 230 Da.

2.4.3.2. Identificação dos compostos livres e esterificados

O tratamento com metóxido de sódio em metanol absoluto (metanólise) permite saponificar e permetilar os ácidos gordos envolvidos na estrutura polimérica da cutina.

Foram analisados, por GC-MS, os compostos extraídos em diclorometano da pasta de folhelho, tal como os produtos da degradação dos mesmos após metanólise. A pasta livre de compostos extractáveis foi também analisada após metanólise.

Os principais compostos existentes nos extractos sililados, antes da metanólise (ED) e nos extractos sililados, após metanólise (EDM) da pasta e na pasta livre de extractáveis, após metanolise e sililação (LED) estão numerados nos cromatogramas da Figura 33 e identificados e quantificados tal como apresenta a Tabela 17. O padrão interno (PI) utilizado foi o tetracosano. Os vários componentes foram identificados por comparação dos seus espectros com a biblioteca Wiley-Nist (Nist MS search 2.0) e, em alguns casos, por comparação dos padrões de fragmentação com dados publicados [43,50,62-66].

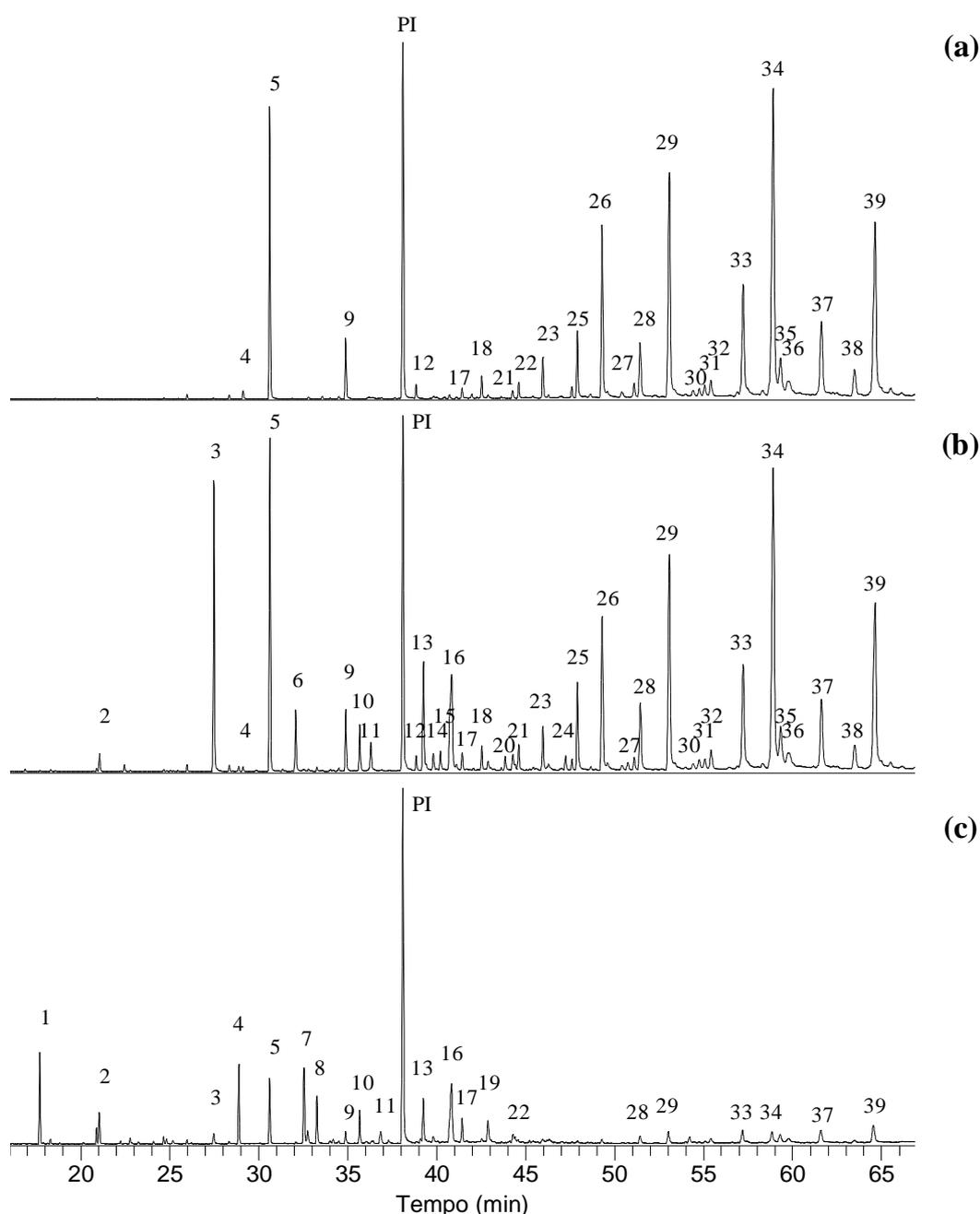


Figura 33: Cromatogramas totais dos extractos em diclorometano derivatizados, (a) antes e (b) após metanolise e (c) da pasta livre de extractos em diclorometano, após metanolise.

A Tabela 17 apresenta a lista dos principais compostos detectados e a sua quantificação.

Tabela 17: Compostos lipofílicos identificados nos extractos (mg de composto/kg de pasta).

Pico	Composto	ED	EDM	LED
1	Ácido 2-hidroxipropanóico, tms éster	28,70	68,49	77,91
2	Ácido gordo não identificado	-	124,17	179,51
3	Ácido Hexadecanóico,éster metílico	-	1681,23	96,08
4	1 - Hexadecanol, tms éster	6,56	34,75	510,38
5	Ácido Hexadecanóico, éster tms	3428,51	1959,00	439,61
6	Ácido Octadecanóico,éster metílico	-	389,95	14,34
7	Octadec-9Z-enol, éter tms	-	22,45	521,95
8	Octadecanol, éter tms	7,28	30,40	348,94
9	Ácido Octadecanóico,éster tms	746,80	397,50	90,24
10	Ácido 7,8-hidroxihexadecanóico, éster metílico	2,54	297,82	236,59
11	Ácido Eicosanóico, éster metílico	78,00	226,30	0,00
12	Ácido Eicosanóico, éster tms	188,35	95,30	11,90
13	Ácido 9,10-hidroxiocetadecanóico, éster metílico	0,76	772,56	396,20
14	Ácido gordo não identificado	72,69	128,14	56,48
15	Ácido Docosanóico, éster metílico	-	125,53	-
16	Ácido 6,7-pentadecanóico, éster metílico	57,90	1238,92	772,80
17	Ácido 9,10-hidroxiocetadecanóico, tms éster	164,85	109,86	192,49
18	Ácido Docosanóico, éster tms	317,99	165,58	37,31
19	Ácido 6,7-pentadecanóico, tms éster	68,16	121,17	257,39
20	Ácido Tetracosanóico, éster metílico	-	113,15	2,47
21	Ácido Tricosanóico, tms éster	106,11	150,81	143,33
22	1-Tetracosanol, éter tms	232,65	187,73	-
23	Ácido Tetracosanóico, éster tms	602,43	308,93	9,57
24	Ácido Nonacosanóico, éster metílico	-	100,19	9,61
25	1-Hexacosanol, éter tms	1003,13	668,38	31,11
26	Ácido Hexacosanóico, éster tms	2854,56	1282,89	37,32
27	Ácido Heptacosanóico, éster tms	256,27	104,45	11,75
28	1-Octacosanol, éter tms	1068,16	626,89	83,47
29	Ácido Octacosanóico, éster tms	4624,95	2142,80	143,51
30	Ácido Nonacosanóico, éster tms	241,70	104,57	20,74
31	Triacontanol, éter tms	364,61	211,30	57,05
32	Ácido Triacontanóico, éster tms	2648,73	1258,07	173,07
33	Ácido Oleanóico, éster tms	7679,80	3744,29	164,31
34	Triterpenóide não identificado	952,03	524,85	125,50
35	Triterpenóide não identificado	444,73	231,93	91,51
36	Ácido Dotriacontanóico, tms éster	1981,81	910,20	183,04
37	Triterpenóide não identificado	712,90	330,86	34,80
38	Triterpenóide não identificado	4965,80	2303,38	255,53
Total compostos mais representativos		35909,46	23294,79	5817,82
Outros/Não identificados		7623,80	4179,98	5531,80
Total		43533,26	27474,78	11349,62

Os extractos em diclorometano representam cerca de 8,2 %(m/m) da pasta de folhelho e são constituídos maioritariamente por ácidos gordos e terpenóides. Foram também identificados hidroxiácidos e álcoois alifáticos de cadeia longa em menores quantidades. Após a metanólise, foi observado um aumento na quantidade total de extractáveis detectados por GC-MS, nomeadamente de hidroxiácidos, o que parece sugerir

a presença de quantidades significativas de estruturas esterificadas e de elevado peso molecular nos extractos iniciais. Na Figura 34 estão representadas as principais famílias e as suas abundâncias nos extractos em estudo.

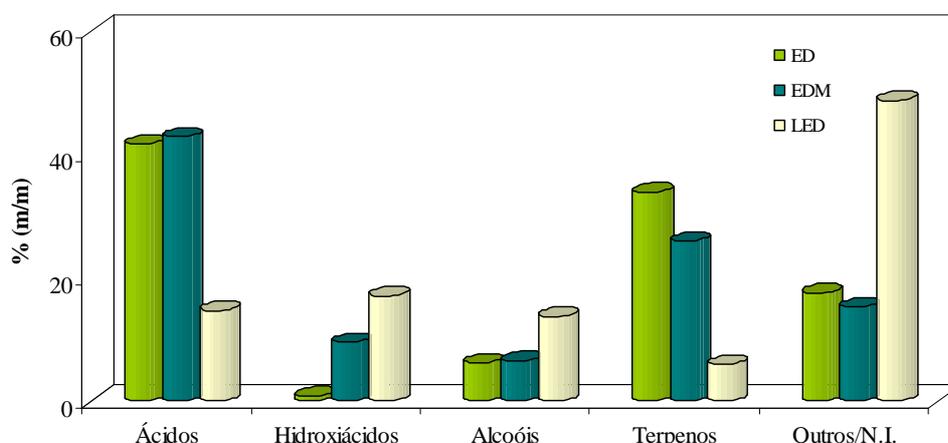


Figura 34: Principais famílias de compostos existentes nos extractos da pasta, (ED) antes e (EDM) após metanólise, e na (LED) pasta livre de extractáveis.

Os ácidos gordos são a família mais representativa dos extractos em diclorometano (41,7%), em que os ácidos octacosanóico, hexadecanóico e hexacosanóico existem em maior abundância. Após a metanólise, verificou-se um aumento dos ácidos gordos e o aparecimento de derivados metilados (ésteres metílicos dos ácidos: hexadecanóico, octadecanóico, eicosanóico, docosanóico, tetracosanóico e nonacosanóico), o que prova a existência de ácidos gordos combinados no extracto inicial, além dos existentes na forma livre. Ao mesmo tempo, verificou-se um número significativo de álcoois de cadeia longa. O que nos leva a supor que estes ésteres de ácidos e de álcoois são constituintes de cutina ligados por ligações éster. É de salientar o aumento significativo de hidroxiácidos especialmente do ácido 7,8-hidroxihexadecanóico, do ácido 9,10-hidroxiocadecanóico e o do ácido 6,7-hidroxipentadecanóico, este facto indica a possível existência de ligações éster entre grupos hidroxilo de hidroxiácidos e ácidos gordos.

A presença de glicerol esterificado com ácido hexadecanóico (0,14%), verificada nos ED, no tempo de retenção de 41 min. mostra uma possibilidade de ramificação na cutina através de derivados de triglicerídeos.

Os ácidos gordos livres, derivatizados sob a forma de ésteres trimetilsililados, são facilmente identificáveis devido ao seu padrão de fragmentação típico. Os sinais dos fragmentos provenientes do grupo a m/z 73 e 75, $[(CH_3)_3Si]^+$ e $[(CH_3)_2SiOH]^+$ respectivamente, e do ião $[M-15]^+$ do grupo TMS são bastante abundantes, existindo ainda fragmentos importantes a m/z 117, 129, 132 e 145, como demonstrado pelo espectro de

massa do derivados TMS do ácido hexadecanóico na Figura 35 (a). Os ácidos gordos sob a forma de ésteres metilados, são facilmente identificados pelos sinais dos fragmentos a m/z 74, 87 e 143, como se verifica na Figura 35 (b) para o éster metílico do ácido hexadecanóico.

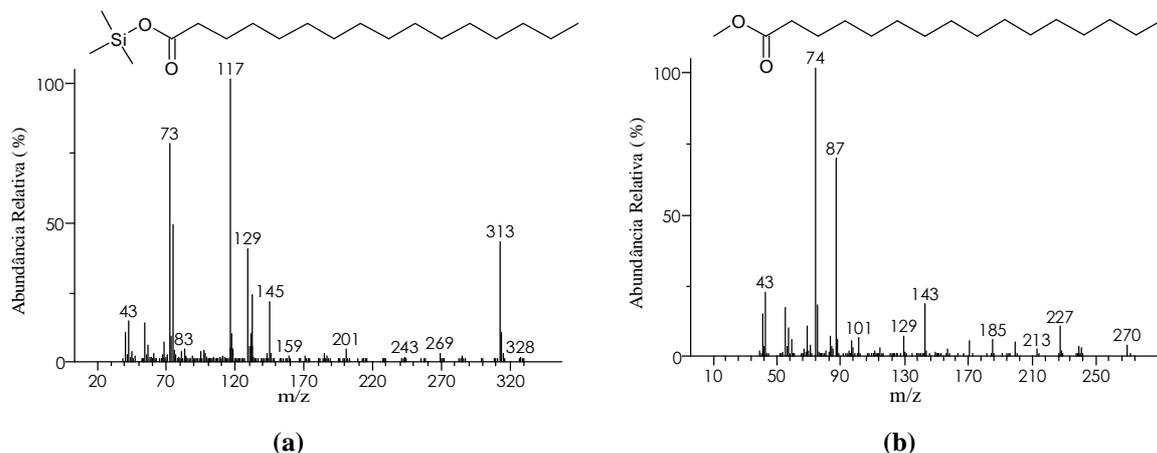


Figura 35: Espectros de massa dos derivados do ácido hexadecanóico: (a) TMS e (b) éster metilado.

Nos extractos em diclorometano foram identificados alguns hidroxiácidos, mas é após a metanólise que estes ganham uma maior importância, nos EDM atingem valores de 9,5 % e nos LED de 17,0 % de proporção mássica. A identificação dos derivados TMS destes compostos foi baseada nos seus padrões de fragmentação típicos, além dos picos característicos dos ésteres dos ácidos gordos trimetilsililados (m/z $[M-15]^+$, 117 e 129) estes compostos distinguem-se ainda pela presença do dois iões a m/z 204 e 217, resultantes do rearranjo dos grupos TMS em compostos de cadeia longa e dos iões a m/z 89 e 103, confirmando-se assim a existência de ω -hidroxiácidos, como o ácido 9,10-hidroxiocetadecanóico, cujo espectro de massa do seu derivado TMS se encontra na Figura 36.

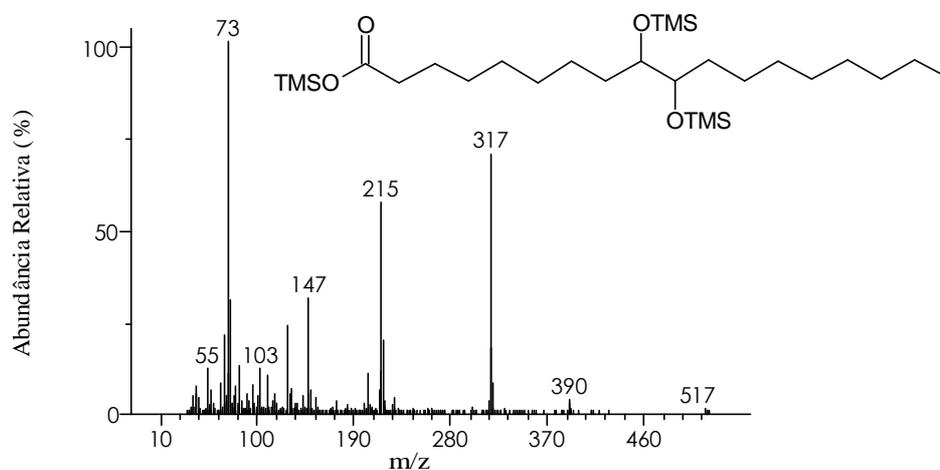


Figura 36: Espectro de massa do derivado TMS do ácido 9,10 - hidroxiocetadecanóico.

Os álcoois alifáticos de cadeia longa representam uma pequena fracção (6,2 %) do teor total de extractáveis. Após a metanólise dos ED, a quantidade destes compostos aumentou ligeiramente, sendo: o 1-octacosanol e o 1-hexacosanol, os álcoois mais abundantes. Contudo é nos LED que os álcoois existem em maior quantidade (13,7 %), sobretudo devido ao 1-hexadecanol e ao 1-octadecanol. A identificação dos derivados TMS dos álcoois alifáticos teve como base o seu padrão de fragmentação típico, que apresentam, em geral, iões intensos a m/z $[M-15]^+$ e 75, assim como iões a m/z 89 e 103 $[(CH_3)_3SiOCH_2]^+$, que permitem distingui-los dos derivados TMS dos ácidos gordos (Figura 37).

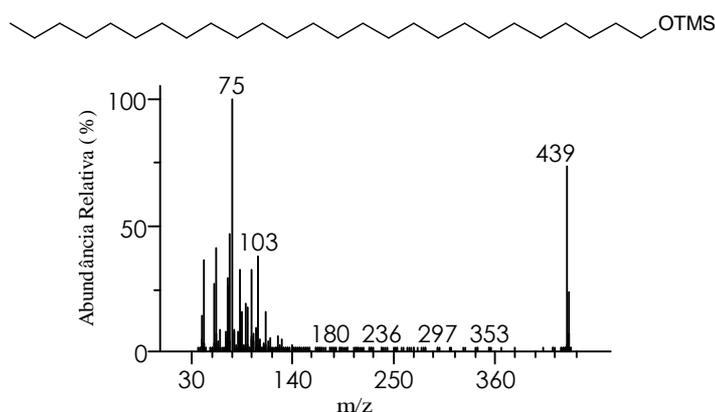


Figura 37: Espectro de massa do derivado TMS do 1-Hexacosanol.

Os terpenos constituem a segunda família mais representativa dos ED (33,9 %), sendo o ácido oleanólico (triterpenóide) o mais abundante. Este triterpenóide foi identificado com base nos seus padrões de fragmentação, em que os fragmentos a m/z 600 $[M]^+$, 585 $[M-CH_3]^+$, 510 $[M-TMSOH]^+$, 495 $[M-TMSOH-CH_3]^+$, 482 $[M-TMSOCH]^+$, 393 $[M-TMSOH-TMSOOC]^+$ e 392 $[M-TMSOH-TMSOCH]^+$ são os sinais mais importantes (Figura 38).

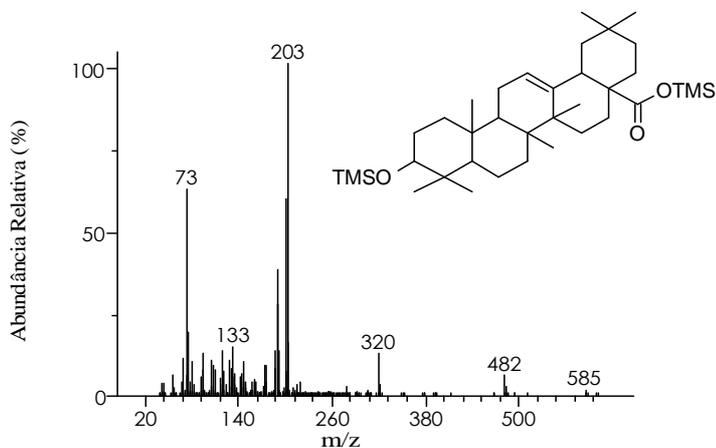


Figura 38: Espectro de massa do derivado TMS do Ácido Oleanólico.

2.4.3.3. Estrutura possível da cutina no folhelho

Os monómeros obtidos após a despolimerização da cutina pela metanólise mostram que estes deveriam estar ligados por ligações éster entre grupos carboxilo de ácidos, grupos hidroxilo de álcoois e grupos hidroxilo de hidroxiácidos. Os ésteres de ácido gordo com glicerol podem apresentar um ponto de ramificação do polímero tal como já foi apresentado, por alguns autores, para a suberina [50,65-67].

Na Figura 39 são apresentados fragmentos hipotéticos para a estrutura da cutina obtidos a partir das proporções dos monómeros apresentados na Tabela 17.

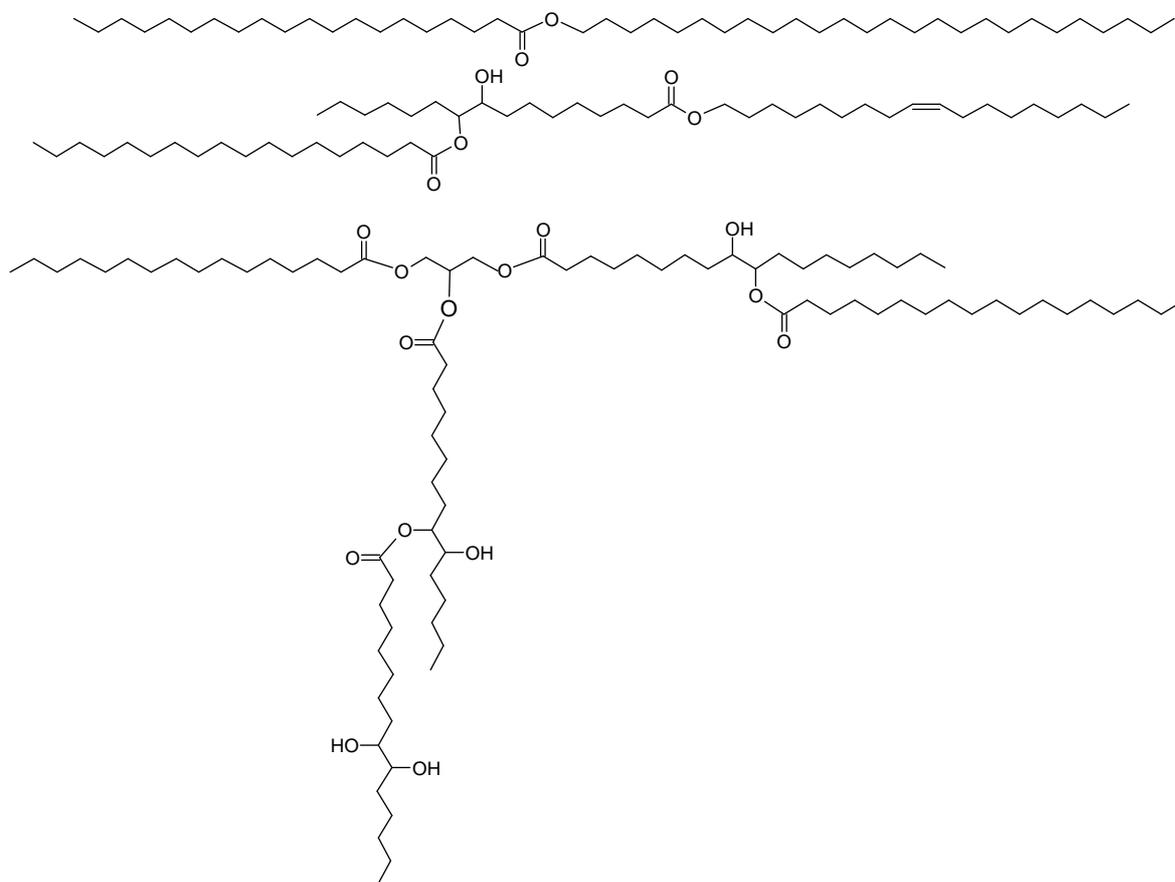


Figura 39: Fragmentos propostas para a estrutura da cutina.

2.5. Viscosidade Intrínseca

A viscosimetria de soluções diluídas é uma técnica sujeita a calibração que permite determinar a massa molecular média de um polímero, assim como obter informações a respeito da dimensão das suas cadeias.

Segundo a norma SCAN-CM 15:88, antes de se proceder às medições no viscosímetro é necessário desintegrar a amostra de pasta, em água, e, em seguida,

solubilizá-la em CED, sendo 30 minutos o tempo máximo indicado para cada uma destas operações [45].

Na determinação da viscosidade da pasta de folhelho, não foi possível a sua desagregação completa mesmo após muitas horas de agitação, devido à forte ligação entre extractáveis e polissacarídeos, que impossibilita a desintegração da pasta. O que justifica o baixo valor obtido (172,6 mL/g) quando comparado com valores típicos para pastas de papel [45, 68].

2.6. Histograma de Fibras

Pela análise do histograma de fibras, obteve-se um comprimento médio de fibras curtas de 0,70 mm, valor semelhante ao das folhosas (e.g. *Eucalyptus globulus*). No entanto este não é o valor verdadeiro, uma vez que o aparelho só mede comprimentos de fibras curtas entre 0,15 e 10 mm e a percentagem de finos (0,00 – 0,15 mm) corresponde a 71,83 %. Como tal, pode afirmar-se que o comprimento médio das fibras da pasta de folhelho é 0,2 mm, o que constitui uma grande parte do histograma da Figura 40.

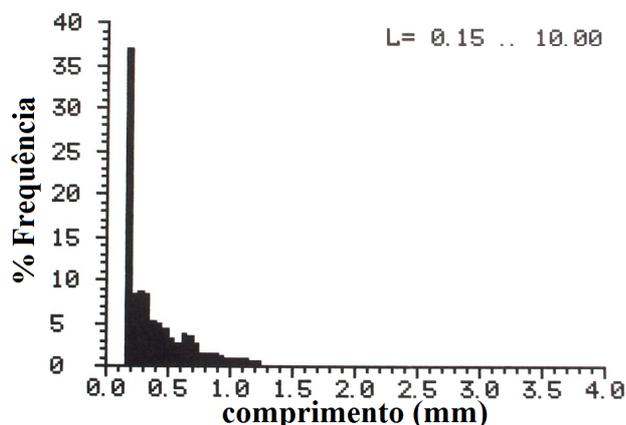


Figura 40: Histograma de fibras.

O comprimento reduzido das fibras e o baixo valor de viscosidade reflectem a dificuldade de drenagem deste material, concluindo-se definitivamente que este material não será bom para a indústria papeleira.

2.7. Medição de Ângulos de Contacto

A interacção entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através da medida do ângulo de contacto (θ). Este é definido como sendo o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme esquematizado na Figura 41.

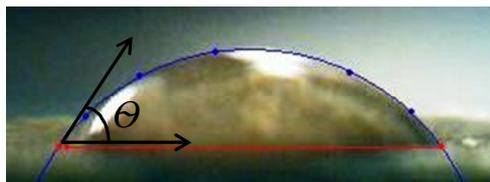


Figura 41: Método da gota sésil para calcular o ângulo de contacto.

A análise por ângulo de contacto pode oferecer informações importantes sobre o comportamento hidrofílico/hidrofóbico de superfícies.

Tabela 18: Ângulo de contacto e componentes de energia de superfície entre uma gota líquida e as superfícies da pasta e do papel.

Amostras	$\theta_{\text{Água}}$ (°)	γ_s^d (mJ/m ₂)	γ_s^p (mJ/m ₂)	Energia livre de superfície (mJ/m ₂)
Película de Pasta	48,80	37,83	2,35	40,18
Papel	23,77	32,52	5,41	37,93

Pelos dados da Tabela 18, referentes aos ângulos de contacto das superfícies da película de pasta e do papel e componentes da energia de superfície (polar e dispersiva), observa-se que a película da pasta apresenta uma superfície menos polar do que a do papel, não deixando penetrar os líquidos tão facilmente, sendo por isso mais hidrofóbica.

2.8. Análise Térmica da Pasta e seus Extractos

2.8.1. TGA

A TGA determina a taxa de decomposição de substâncias, pela avaliação das perdas de massa em função da temperatura. Os resultados obtidos para a pasta e para os extractáveis em diclorometano da pasta estão apresentados na Figura 42.

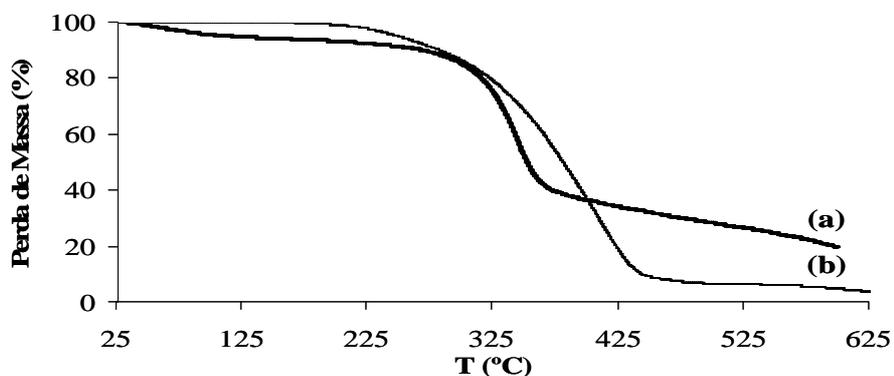


Figura 42: Curvas da TGA da pasta (a) e dos extractáveis da pasta (b).

Na curva de TGA da pasta verifica-se uma curva relativa à perda de água contida na amostra. A partir da Figura 42, pode-se ainda observar uma curva relativa aos extractáveis que apresenta uma degradação a menor temperatura (a partir de 230°C) do que a pasta (a partir de 300°C). Este facto pode estar relacionado com a degradação de ácidos gordos e seus derivados, uma vez que estudos de derivados de pastas com anidridos de ácidos gordos mostram que os derivados de ácidos gordos degradam-se mais rapidamente do que os componentes da pasta [53,67,69,70].

A temperatura máxima de degradação da pasta encontra-se à volta dos 345°C que é típico para estes tipos de materiais (pastas celulósicas).

2.8.2. DSC

A DSC é uma técnica de análise que permite determinar as temperaturas onde ocorrem transições de fase (temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_f)) das substâncias observadas através da perda e/ou ganho de calor, complementando a técnica de termogravimetria [53,67,69,70].

As curvas de DSC para pasta e para os extractáveis em diclorometano da pasta estão apresentadas na Figura 43.

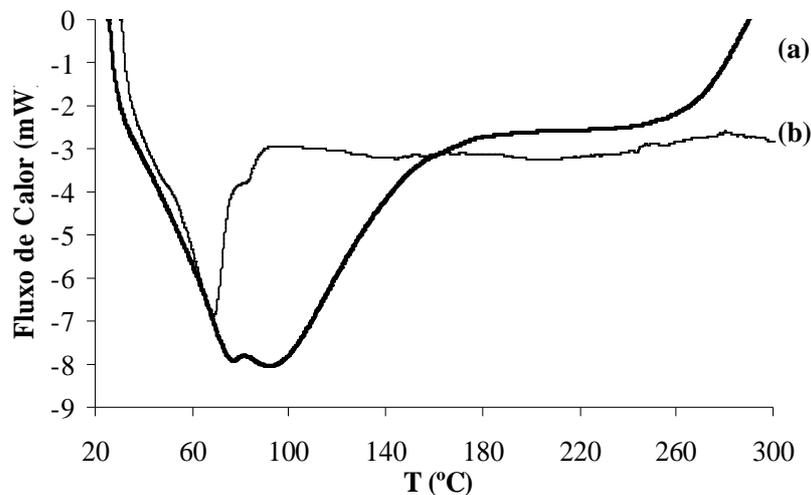


Figura 43: Curvas de DSC da (a) pasta e dos (b) extractáveis da pasta.

Na curva DSC da pasta (Figura 43-(a)) verifica-se um desvio endotérmica que apresenta um mínimo de 75°C e máximo de 100°C. O desvio endotérmico apresentado na Curva DSC relativa aos extractáveis (Figura 43-(b)) apresenta um valor próximo dos 65°C. Estes desvios são atribuídos à eliminação de humidade das amostras. Nota-se que esta eliminação é mais rápida para os extractáveis o que se justifica pelo carácter hidrofóbico

destes compostos. Estas observações confirmam a perda de água verificada nas análises de termogravimetria.

A curva DSC dos extractáveis (Figura 43-(b)) apresenta um ligeiro desvio a 230°C (aproximadamente) que está relacionado com a decomposição térmica da amostra, devida à quebra das suas ligações, facto confirmado por TGA, em que se verifica à mesma temperatura o início da degradação dos extractáveis.

CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

A valorização dos subprodutos da vitivinificação é um assunto ainda pouco desenvolvido, verificando-se uma enorme carência bibliográfica sobre ao assunto. Com este trabalho pretendeu-se dar um contributo no desenvolvimento dessa área que representa uma mais-valia para as empresas do sector aliado ao interesse ambiental.

O estudo da composição química do folhelho foi efectuado de forma a avaliar o potencial do mesmo como matéria-prima, nomeadamente na produção de pastas e biocompósitos.

O folhelho foi caracterizado quanto ao seu teor em cinzas (7, 8%), extractáveis em acetona (5,7 %), diclorometano (5,5 %) e água (26,4 %), proteínas (18,8 %), taninos (13,8 %), resíduo insolúvel em ácido a 72 % (22,4 %), celulose *Kürscher e Höffer* (20,8 %) e hemiceluloses (24,9 %).

O resíduo insolúvel em ácido (lenhina *Klason*), foi caracterizado estruturalmente por FTIR e por RMN CP/MAS de ^{13}C , não se tendo verificado as bandas e ressonâncias correspondentes à lenhina, concluindo-se que esta não existe em quantidades significativas no folhelho.

A existência de celulose foi comprovada por análise de açúcares, FTIR, RMN ^{13}C CP/MAS e DRX, tendo sido obtido um grau de cristalinidade de 66,1 %, semelhante aos valores verificados na literatura para diferentes origens vegetais, que possuem a estrutura cristalina da celulose I.

Pela análise dos açúcares neutros, comprovou-se que o folhelho é essencialmente constituído por celulose, mas também por mananas, arabinanas, xilanas e xiloglucanas.

As substâncias solúveis em água quente foram caracterizadas quanto à distribuição do seu peso molecular e ao seu teor em açúcares e analisadas por espectroscopia de próton e de correlação. Pela análise de GPC obteve-se uma distribuição bimodal, em que a 1ª fracção eluída é polissacarídica com um peso molecular médio ponderado mais elevado ou com uma estrutura mais ramificada, do que na 2ª fracção, o que origina um volume hidrodinâmico mais elevado. Os açúcares maioritários presentes neste polissacarídeo são a manose, a glucose, a arabinose e a galactose, como tal verificou-se que a cadeia principal deste polissacarídeo é constituída por unidades de anidro β -D-manopiranosose e por unidades de anidro β -D-glucopiranosose ligadas entre si por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4).

Para a obtenção de pastas a partir do folhelho foram escolhidos dois processos: o cozimento kraft e o tratamento oxidativo organosolv. O cozimento kraft não apresentou resultados satisfatórios, obteve-se uma substância escura e de difícil aplicação. Pelo tratamento organosolv com ácido peracético foi obtida uma pasta cerosa.

A pasta obtida pelo tratamento com ácido peracético, foi caracterizada por FTIR e por RMN ¹³C de CP/MAS, verificando-se que o tratamento oxidativo levou à degradação de taninos e substâncias pécnicas, assim como de hemiceluloses. Concluindo-se que a pasta é essencialmente constituída por celulose e por compostos poliméricos do tipo cutina.

A cutina isolada da pasta, por extracção com diclorometano, foi analisada quanto ao seu peso molecular e estrutura química. A distribuição molecular da cutina extraída revelou um carácter multimodal, com uma fracção monomérica (29 %) de peso molecular médio ponderado de 240 Da e uma fracção polimérica (71 %) de peso molecular médio ponderado de 3600 Da. A fracção polimérica da cutina é principalmente constituída por ácidos gordos, hidroxiácidos e álcoois de cadeia longa ligados entre si por ligações éster. Foram propostos fragmentos hipotéticos da estrutura da cutina de folhelho de uva.

O baixo valor de viscosidade intrínseca da pasta, assim como o reduzido comprimento médio das fibras (inferior a 0,2 mm) revela que a pasta não poderá ser aplicada na indústria papelreira, uma vez que apresenta dificuldades de drenagem. Este facto pode ser confirmado pela análise dos ângulos de contacto, uma vez que a pasta apresenta uma superfície mais hidrofóbica do que o papel.

As análises térmicas efectuadas à pasta e aos extractáveis em diclorometano, revelam que os extractos se degradam a menor temperatura do que as pastas, o que se justifica pelo carácter hidrofóbico destas substâncias.

A pasta de folhelho foi ainda só superficialmente caracterizada, sendo necessário um estudo exaustivo de forma a encontrar aplicações para este material derivado de recursos renováveis. No entanto, a presença de cutina (substância cerosa) permite antever a utilização destes compostos em biocompósitos ou mesmo em aplicações biomédicas.

1. TRABALHO FUTURO

Este trabalho pretende proporcionar uma nova abordagem de valorização do folhelho de modo a contribuir para um sector vitivinícola mais sustentado. No entanto, estes estudos deverão ser mais aprofundados e novas linhas de investigação deverão ser desenvolvidas de forma a avaliar todos os potenciais de aplicabilidade deste recurso renovável, nomeadamente:

- Estudo estrutural detalhado dos polissacarídeos do folhelho;
- Estudo sobre o bioprocessamento de polissacarídeos solúveis em água para a produção de bioetanol;
- Estudo sobre a reutilização de ácido acético;
- Estudos sobre a produção de biocompósitos, biofilmes e até mesmo hidrogéis usando pasta de folhelho como matéria-prima;
- O estudo do potencial do folhelho não fermentado para a obtenção de pastas.

CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Comissão Europeia, 2007, Reforma do sector vitivinícola: Proposta da Comissão, (Disponível em: http://ec.europa.eu/agriculture/capreform/wine/index3_pt.htm, consultado em Novembro de 2007).
- 2 Comunidades Europeias, 2007, Para um Sector Vitivinícola Europeu Sustentável, Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias, Luxemburgo (Disponível em: http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/wine/072007_pt.pdf, consultado em Novembro de 2007).
- 3 Portaria n.º 700/2008 de 29 de Julho, do Diário da República, 1.ª série, n.º 145.
- 4 Campanha, 2004, Inventário das superfícies vitícolas. (Disponível em: <http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/prod/inventaire.pdf>, acedido em Novembro de 2007).
- 5 Dias, J. P., 2006, Fases de Maturação da Uva, Centésimo Curso Intensivo de Vinificação, DRABL – Direcção Regional da Agricultura da Beira Interior, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. (Disponível em: http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/maturacao_uva.pdf, consultado em Dezembro de 2007).
- 6 Ribbèreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2000, The Grape and its Maturation *in* Handbook of Enology, volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications, John Wiley, England, cap. 10, pp. 219-268.
- 7 Del Solar D., C. E., Irarrázaval M., P., Soza P., J. A., Depallens L., D., Esquivel M., J., 2002, Resonancia Magnética (Scanner-MRI) en CV. THOMPSON (*Vitis Vinifera L.*) seedless como posible técnica para evaluar condicion en postcosecha, *PHAROS*, Revista Semestral de la Universidad de las Américas, 9 (2), pp. 29-64. (Disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/208/20809204.pdf>, consultado em Dezembro de 2007).
- 8 Navarre, C., 1997, Enologia, Técnicas de Produção do Vinho, Coleção EUROAGRO, Publicações Europa-América, Mem Martins.
- 9 Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A. S., 2006, Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends Food Sci Tech*, 17, 579-590.

- 10 Garcia, A. F., 2004, Automatización de una Planta Vinificadora, Departament d'Enginyeria Electrónica Eléctrica i Automática, Universitat Rovira I Virgili. (Disponível em: <http://sauron.etsr.urv.es/public/propostes/pub/pdf/611pub.pdf>, consultado em Dezembro de 2007).
- 11 Ribbèreau- Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000, Carbohydrates *in* Handbook of Enology, volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, John Wiley, England, cap. 3, pp. 55-80.
- 12 Fengel, D., Wegener, G., 1989, Cellulose *in* Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter & Co, Berlim, cap. 4, pp. 66- 105.
- 13 Sjöström, E., 1993, Wood Polysaccharides *in* Wood Chemistry: Fundamentals and Applications, Second Edition, Academic Press, San Diego, cap. 3, pp. 51-70.
- 14 Zabel, R. A., Morrell, J. J., 1992, Wood Microbiology, Decay and Its Prevention, Academic Press, INC., Toronto;
- 15 Schniewind, A. P., 1989, Concise Encyclopedia of Wood & Wood-based Materials, Pergamon Press, Berkeley.
- 16 Krässig, H.A., 1993, The Fiber Structure *in* Cellulose. Structure, Accessibility and Reactivity, Gordon and Breach Science Publishers, Polymer Monographs volume 11, Yverdon, cap. 2, pp. 6-41.
- 17 Fengel, D., Wegener, G., 1989, Polyoses (Hemicellulose) *in* Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter & Co, Berlim, cap. 5, pp. 106- 131.
- 18 Fengel, D., Wegener, G., 1989, Lignin *in* Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter & Co, Berlim, cap. 6, pp. 132-181.
- 19 Sjöström, E., 1993, Lignin *in* Wood Chemistry: Fundamentals and Applications, Second Edition, Academic Press, San Diego, cap. 4, pp. 71-89.
- 20 Lewin, M., Goldstein, I. S., 1991, Wood structure and composition, Marcel Dekker, New York.
- 21 Ribbèreau- Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000, Alcohols and Other Volatile Compounds *in* Handbook of Enology, volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, John Wiley, England, cap. 2, pp. 41-54.
- 22 Ribbèreau- Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000, Organic Acids in Wine *in* Handbook of Enology, volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, John Wiley, England, cap. 1, pp. 3-39.
- 23 Mamede, M. E. O., Pastore, G. M., 2004, Compostos Fenólicos do Vinho: Estrutura e Ação Antioxidante, *B.CEPPA*, Curitiba, 22 (2).

- 24 Ribbèreau- Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000, Phenolic Compounds *in* Handbook of Enology, volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, John Wiley, England, cap.6, pp. 127-185.
- 25 Sjöström, E., Extractives *in* Wood Chemistry: Fundamentals and Applications, Second Edition, Academic Press, San Diego, cap. 5, pp. 90-113.
- 26 Queiroz, C. R. A. A., Morais, S. A. L., Nascimento, E. A., 2002, Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*), *Rev Árvore*, 26 (4), 485-492.
- 27 Ribbèreau- Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000, Varietal Aroma *in* Handbook of Enology, volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, John Wiley, England, cap. 7, pp. 186-206.
- 28 Fengel, D., Wegener, G., 1989, Extractives *in* Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter & Co, Berlim, cap. 7, pp. 182-223.
- 29 Ribbèreau- Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000, Nitrogen Compounds *in* Handbook of Enology, volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, John Wiley, England, cap. 5, pp. 99-128.
- 30 Silva, L. M., 2001, Aproveitamento de Subprodutos da Vinificação, Seminário do Curso de Mestrado em Controlo de Qualidade, Universidade do Porto, Porto.
- 31 Costa, J. M., 1983, Aproveitamento de subprodutos da vinificação. O bagaço como matéria-prima da indústria de óleos e grainha e de fabrico de rações para gado, 1º congresso nacional das indústrias agro-alimentares, Junta Nacional dos Vinhos, Lisboa.
- 32 Silva, L. M., 2003, Caracterização dos Subprodutos da Vinificação, *Spectrum Millenium*, 28, 123-133.
(Disponível em: <http://www.ipv.pt/millenium/Millenium28/10.pdf>, consultado em Outubro de 2007).
- 33 Sjöström, E., 1993, Wood Pulping *in* Wood Chemistry: Fundamentals and Applications, Second Edition, Academic Press, San Diego, cap. 7, pp. 114-164.
- 34 Biermann, C. J., 1996, Handbook of Pulping and Papermaking, Academic Press, 2ª ed., San Diego.
- 35 Casey, J. P., 1980, Pulp and paper: chemistry and chemical technology, volume 1, John Wiley, New York.
- 36 Young, R. A., Akhtar, M., 1998, Milox Pulping and Bleaching *in* Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, John Wiley, New York, cap. 5, pp. 157-161.

- 37 Brasileiro, L. B., Colodette, J. L., Pilo-Veloso, D., 2001, A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas, *Química Nova*, 24 (6), 819-829.
- 38 Muurinen, E., 2000, Organosolv Pulping, a review and distillation study related to peroxyacid pulping, Department of Process Engineering, University of Oulu, FIN-90014 Oulu University Library, Finland.
- 39 Young, R. A., Akhtar, M., 1998, Elemental Chlorine Free (ECF) and Totally Chlorine Free (TCF) Bleaching of Pulps in Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, John Wiley, New York, cap. 7, pp. 245-246.
- 40 Farrand, J. C., 1969, The peroxyacetic acid oxidation of 4-methylphenols and their methyl ethers, Doctor's Dissertation, Institute of Paper Chemistry, Wisconsin.
- 41 Solomons, T. W. G., 1994, Aldehydes and Ketones I. Nucleophilic Additions to the Carbonyl Group in Fundamentals of Organic Chemistry, Fourth Edition, John Wiley, USA, pp. 642-685.
- 42 Neto, C. P., Seca, A., Fradinho, D., Coimbra, M. A., Domingues, F., Evtuguin, D., Silvestre, A., Cavaleiro, J. A. S., 1996, Chemical composition and structural features of the macromolecular components of *Hibiscus cannabinus* grown in Portugal, *Ind Crop Prod*, 5, 189-196.
- 43 Lopes, M. H., Gil, A. M., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., 2000, Composition of Suberin Extracted upon Gradual Alkaline Methanolysis of *Quercus suber L.* Cork, *J Agr Food Chem*, 48, 383-391.
- 44 Evtuguin, D. V., Rebuzzi, F., 2006, Effect of Glucuronoxylan on the Hornification of *Eucalyptus Globulus* Bleached Pulps, *Macromol Symp*, 232, 121-128.
- 45 SCAN-CM 15:88, 1998, Viscosity in cupri-ethylenediamine solution, Scandinavian Pulp, Paper and Board, Testing Committee.
- 46 Duarte, R. F., 2008, Revestimento de papéis com formulações à base de alcóxidos e sua aptidão para impressão, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- 47 Owens, D. K., Wendt, R. C., 1969, Estimation of the Surface Free Energy of Polymers, *J Appl Polym Sci*, 13, 1741-1747.
- 48 Benítez, J. J., Matas, A. J., Heredia, A., 2004, Molecular characterization of the plant biopolyester cutin by AFM and spectroscopic techniques, *J Struct Biol*, 147, 179-184.
- 49 Lopes, M. H., Neto, C. P., Barros, A. S., Rutledge, D., Delgadillo, I., Gil, A. M., 2000, Quantification of Aliphatic Suberin in *Quercus suber L.* Cork by FTIR

- Spectroscopy and Solid-State ^{13}C -NMR Spectroscopy, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 57, 344-351.
- 50 Cordeiro, N., Belgacem, M. N., Silvestre, A. J. D., Neto, C.P., Gandini, A., 1998, Cork Suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition, *Int J Biol Macromol*, 22, 71-80.
- 51 Zeier, J., Schreiber, L., 1997, Chemical Composition of Hypodermal and Endodermal Cell Walls and Xylem Vessels Isolated from *Clivia miniata*, *Plant Physiol*, 113, 1223-1231.
- 52 Oliveira, L., Cordeiro, N., Evtuguin, D. V., Torres, I. C., Silvestre, A. J. D., 2007, Chemical composition of different morphological parts from “*Dwarf Cavendish*” banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products, *Ind Crop Prod*, 26, 163-172.
- 53 Filho, G. R., Monteiro, D. S., Meireles, C. S., Assunção, R. M. N., Cerqueira, D. A., Barud, H. S., Ribeiro, S. J. L., Messadeq, Y., 2008, Synthesis and characterization of cellulose acetate produced from recycled newspaper, *Carbohyd Polym*, 73, 74-82.
- 54 Seca, A. M. L., Cavaleiro, J. A. S., Domingues, F. M. J., Silvestre, A. J. D., Evtuguin, D., Neto, C. P., 1998, Structural Characterization of the Bark and Core Lignins from Kenaf (*Hibiscus cannabinus*), *J Agr Food Chem*, 46, 3100-3108.
- 55 Seca, A. M. L., Cavaleiro, J. A. S., Domingues, F. M. J., Silvestre, A. J. D., Evtuguin, D., Neto, C. P., 2000, Structural Characterization of the Lignin from the Nodes and Internodes of *Arundo donax Reed*, *J Agr Food Chem*, 48, 817-824.
- 56 Hawkes, G. E., Smith, C. Z., Utley, J. H. P., Vargas, R. R., Viertler, H., 1993, A Comparison of Solution and Solid State ^{13}C NMR Spectra of Lignins and Lignin Model Compounds, *Holzforschung*, 47, 302- 312.
- 57 Andersson, S., Wikberg, H., Pesonen, E., Maunu, S. L., Serimaa, R., 2004, Studies of crystallinity of Scots pine and Norway spruce cellulose, *Trees*, 18, 346–353.
- 58 Neto, C. P., Evtuguin, D., Pinto, P., Silvestre, A., Freire, C., Química da Madeira de *Eucalyptus Globulus*: Especificidades e Impacto nos Processos de Cozimento e de Branqueamento. (Disponível em: <http://www.tecnicepa.com/files/Quimica%20da%20madeira%20de%20eucalyptus%20globulus.pdf>, consultado em Janeiro de 2008).
- 59 Teleman, A., Nordström, M., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O., 2003, Isolation and characterization of *O*-acetylated glucomannans from aspen and birch wood, *Carbohyd Res*, 338, 525–534.

- 60 Lisboa, S. A., Evtguin, D. V., Neto, C. P., 2007, Characterization of non-cellulosic glucans in *Eucalyptus globulus* Labill. wood and kraft pulp, *Holzforschung*, 61, 478–482.
- 61 Nunes, F. M., Reis, A., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M., Coimbra, M. A., 2008, Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans, *Phytochemistry*, 69, 1573–1585.
- 62 Bento, M. F., Pereira, H., Cunha, M. A., Moutinho, A. M. C., Berg, K. J., Boon, J. J., 1998, Thermally Assisted Transmethylation Gas Chromatography – Mass Spectrometry of Suberin Components in Cork from *Quercus suber* L., *Phytochem Analysis*, 8, 75-87.
- 63 Graça, J., Pereira, H., 2000, Methanolysis of Bark Suberins: Analysis of Glycerol and Acid Monomers, *Phytochem. Analysis*, 11, 45-51.
- 64 Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., 2002, Identification of New Hydroxy Fatty Acids and Ferulic Acid Esters in the Wood of *Eucalyptus globulus*, *Holzforschung*, 56, 143-149.
- 65 Gandini, A., Neto, C. P., Silvestre, A. J. D., 2006, Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materials, *Prog Polym Sci*, 31, 878-892.
- 66 Graça, J., Santos, S., 2007, Suberin: A Biopolyester of Plants' Skin, *Macromol Biosci*, 7, 128-135.
- 67 Cordeiro, N., Belgacem, M. N., Silvestre, A. J. D., Gandini, A., Neto, C.P., 1998, Cork Suberin as a new source of chemicals. 2. Crystallinity, Thermal and Rheological Properties, *Bioresource Technol*, 63, 153-158.
- 68 Sjöholm, E., Gustafsson, K., Berthold, F., Colmsjö, A., 2000, Influence of the carbohydrate composition on the molecular weight distribution of kraft pulps, *Carbohydr Polym*, 41, 1-7.
- 69 Tsujiyama, S., Miyamori, A., 2000, Assignment of DSC thermograms of wood and its components, *Thermochimica Acta*, 351, 177-181.
- 70 Jandura, P., Riedl, B., Kokta, B. V., 2000, Thermal degradation behavior of cellulose fibers partially esterified with some long chain organic acids, *Polym Degrad Stabil*, 70, 387-394.