



**SÓNIA OLIVEIRA  
PROZIL**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ENGAÇO DA UVA  
E POSSÍVEIS APLICAÇÕES**





**SÓNIA OLIVEIRA  
PROZIL**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ENGAÇO DA UVA  
E POSSÍVEIS APLICAÇÕES**

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 Evtuyugin, 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.



“É facto que sou ignorante e isso é uma verdade que subsiste e que é bem triste para mim, mas que tem uma vantagem: o ignorante ousa mais e, por isso, pretende suportar por mais algum tempo essa ignorância e as suas nefastas consequências, desde que as forças não me faltem.”

Franz Kafka em *O Castelo*



## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Armando Jorge Domingues Silvestre**

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

**Prof. Dr. Luís Eugénio Teixeira de Lemos**

Professor coordenador de nomeação definitiva e Director do Departamento de Ambiente da Escola Superior de Tecnologia de Viseu do Instituto Superior Politécnico de Viseu.

**Prof. Dr. Dmitry Evtyugin**

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. 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**

A realização deste trabalho só foi possível com a colaboração de várias pessoas a quem desejo sinceramente agradecer.

Ao Professor Doutor Dmitry Evtugin e à Professora Doutora Luísa Paula Valente da Cruz Lopes por toda a orientação científica prestada, pela disponibilidade, empenho, amizade e preciosa cooperação ao longo deste trabalho.

À Adegas Cooperativas de Silgueiros pela disponibilização da matéria-prima fundamental para a realização deste trabalho.

À Tavfer pelo apoio financeiro ao longo deste trabalho.

À Joana Mendes pela sua preciosa ajuda em todo o trabalho, pela sua amizade e compreensão, a quem sou verdadeiramente grata.

Não poderia deixar de agradecer à Eng.<sup>a</sup> Ana Caço pela sua disponibilidade em ajudar e pelas suas boas palavras em horas mais tristes.

Aos meus colegas de laboratório do Cefasi, pela sempre boa disposição e por todo o companheirismo.

À minha família e amigos por todo apoio e compreensão, e por serem um porto seguro em dias de tempestade.

Ao Pedro, pela sua peculiar maneira de me apoiar, por toda a ajuda prestada ao longo do trabalho e pelo enorme carinho.



## palavras-chave

Engaço da uva, composição química, celulose, lenhina, cozimento oxidativo, acetilação

## resumo

O engaçó da uva é um subproduto gerado no processo de vinificação com potencial de valorização. Este trabalho teve como principal objectivo contribuir para a caracterização química do engaçó da uva e para a utilização deste como matéria-prima para novos materiais. A composição química do engaçó revelou que é um material lenhocelulósico, onde o componente maioritário é a celulose (30,3%), seguindo-se as hemiceluloses insolúveis em água quente (21%) e a lenhina (17,4%). Relativamente aos outros componentes, é de destacar a elevada presença de taninos (15,9%) e de extractáveis em água quente (23,7%). Pela análise dos monossacarídeos averiguou-se que as xilanas são o segundo polissacarídeo maioritário no engaçó depois a celulose (cerca de 12%). A celulose foi caracterizada por difracção de raios-X, e verificou-se que se trata de Celulose I com elevado grau de cristalinidade (75%). A lenhina foi isolada e caracterizada estruturalmente por oxidação com nitrobenzeno, FTIR, GPC, RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, RMN de  $^1\text{H}$  e RMN 2D. Verificou-se que estamos perante uma lenhina do tipo GS com elevada predominância das unidades G. A razão encontrada entre as unidades H, G e S foi de 3:71:26. Por RMN a duas dimensões comprovou-se a predominância de ligações  $\beta$ -5 e  $\beta$ -O-4 na estrutura da lenhina. O peso molecular médio ponderado ( $M_w$ ) da lenhina foi determinado por GPC (2600 Da), valor típico para lenhinas-dioxano de plantas anuais e da madeira.

A obtenção da matéria fibrosa (pasta) pelo cozimento kraft revelou-se ineficiente, uma vez que não deslenhificou o engaçó da uva (a lenhina aumentou de 17,4% na matéria-prima para 33,3 % no material obtido após o cozimento). O cozimento oxidativo com ácido peracético mostrou-se, por sua vez, bastante eficiente na deslenhificação. As condições foram optimizadas de modo a obter maiores rendimentos (35-38%) e pastas com menores teores de lenhina residual (cerca de 2-3%). As pastas apresentaram uma viscosidade intrínseca relativamente baixa (menor do que  $400\text{ cm}^3/\text{g}$ ) quando comparado com pastas kraft de resinosas e folhosas. Isto pode ser explicado pelo facto do cozimento oxidativo ter-se mostrado bastante agressivo (o que levou à degradação de parte dos polissacarídeos) e também pelo facto da pasta ser constituída por celulose e xilanas. As pastas foram modificadas por acetilação parcial em fase heterogénea. O estudo da cinética da acetilação permitiu concluir que os tempos de reacção 2 e 5 minutos são os que produzem materiais com graus de substituição entre 1,43 e 1,48, portanto materiais potencialmente biodegradáveis e mais amigos do ambiente. Por RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS averiguou-se que os grupos OH nas posições 6 e 2 foram preferencialmente acetilados.

As temperaturas de transição vítrea das pastas acetiladas durante 5 minutos ( $T_g$  a 170 °C) e 15 minutos ( $T_g$  a 150°C) foram determinadas por DSC.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que o engaço da uva apresenta potencial para a obtenção de pasta celulósica, que poderá ser aplicada na produção de pasta de papel ou em compósitos. Uma vez que o engaço da uva é um material muito difícil de deslenhificar, torna-se portanto necessário investigar outros métodos de produção de pasta, como por exemplo o método termo-mecânico e o químico-termo-mecânico.

## keywords

Grape stalks, chemical composition, cellulose, lignin, oxidative cooking, acetylation

## Abstract

Grape stalks are a winemaking subproduct potentially susceptible to valorization. The main goal of this work was to contribute for the chemical characterization of grape stalks and for its use as raw-material for new materials. Its chemical characterization showed that grape stalks are lignocellulosic materials, in which cellulose is the major component (with around 30%), followed by insolvent hemicelluloses in hot water (21%) and lignin (17,4%). Regarding other components, it's important to highlight the high presence of tannins (15,9%) and extractables in water (23,7%). Taking into account the monosaccharide's analysis, it can be verified that, after cellulose, xylans are the second major polysaccharide component present in grape stalks (with around 12%). Cellulose was characterized by X-ray diffraction as Cellulose I with a high degree of crystallinity (75%). Lignin was isolated and structurally characterized by oxidation with nitrobenzene, FTIR, GPC,  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR,  $^1\text{H}$  NMR and 2D NMR. It can be verified that we're in presence of a GS type Lignin with high predominance of G units. 3:71:26 was the reason found between the units H, G and S. The use of two dimensions NMR (COSY) proved the predominance of  $\beta$ -5 and  $\beta$ -O-4 links in the lignin structure. The lignin's average molecular weight ( $M_w$ ) was determined by GPC (2600 Da), a typical value for dioxin-lignins of annual plants and wood.

The acquisition of fibrous matter (pulp) by the kraft method was ineffective, given that the deslignification of grape stalks was not achieved (lignin raised from 17,4% in the raw-material to 33,3% in the material obtained after cooking). On the contrary, the oxidative cooking with peracetic acid revealed itself effective in the removal of lignin (deslignification). The conditions were optimized so greater yields (35-38%) and pulps with less residual lignin content (around 2-3%) would be achieved. Pulps present a relatively low level of intrinsic viscosity (less than  $400\text{ cm}^3/\text{g}$ ) when compared with softwood and hardwood kraft pulps. This can be explained by the fact that the oxidative cooking was quite aggressive (which led to the degradation of part of the polysaccharides) and also by the fact that the pulp is constituted by cellulose and xylans.

Pulps were modified by partial acetylation in heterogeneous phase. The acetylation kinetic study allowed us to conclude that the reaction times 2 and 5 minutes are the ones that produce materials degrees of substitution between 1,43 and 1,48, thus potentially biodegradable and more environmentally friendly materials. The use of  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR revealed that the OH groups in positions 6 and 2 were preferentially acetylated. The glass transition temperatures of the acetylated pulps during 5 (Tg at  $170^\circ\text{C}$ ) and 15 minutes (Tg at  $150^\circ\text{C}$ ) were determined by DSC.

The results obtained in this work allow us to conclude that grape stalks present potential for the attainment of cellulosic pulp, which can be applied in pulp production of paper or composites. Given that grape stalks are a very difficult material to deslignificate, it becomes necessary to research other methods; for instance: thermo-mechanical and chemical-thermo-mechanic methods.

## Símbolos e Abreviaturas

<i>b</i>	Altura média de cristalito
<b>CED</b>	Cuprietenodiamina
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulose
<b>COSY</b>	Espectroscopia de correlação homonuclear
<i>d</i>	Espaçamento entre planos
<i>d<sub>L</sub></i>	Parâmetro relacionado com a distância entre os planos de rede 002
<i>d<sub>002</sub></i>	Largura média de cristalito no plano de rede 002
<b>DS</b>	Grau de substituição
<b>DSC</b>	Calorimetria diferencial de varrimento
<b>E</b>	Teor de extractáveis
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<b>G</b>	Unidades do tipo guaiacilo
<b>GC/MS</b>	Cromatografia gasoso com espectroscopia de massa
<b>GPC</b>	Cromatografia de permeação de gel
<b>H</b>	Unidades do tipo <i>p</i> -hidroxifenilo
<b>I<sub>am</sub></b>	Intensidade das regiões de celulose amorfa
<b>I<sub>c</sub></b>	Intensidade das regiões de celulose cristalina
<b>IC</b>	Índice de cristalinidade
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>IVV</b>	Instituto do Vinho e da Vinha
<b>L</b>	Teor de lenhina
<b>M<sub>w</sub></b>	Peso molecular médio ponderado
<b>OCM</b>	Organização Comum de Mercado
<b>P</b>	Teor de proteínas
<b>Pa</b>	Ácido peracético
<b>P<sub>f</sub></b>	Ácido perfórmico
<b>RMN de <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
<b>RMN de <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de protão
<b>S</b>	Unidades do tipo seringilo
<b>SAU</b>	Superfície Agrícola Utilizada

<b>T</b>	Teor de taninos
<b>TAPPI</b>	Technical association of the pulp and paper industry (Associação técnica da indústria da pasta e do papel)
<b>Tg</b>	Temperatura de transição vítrea
<b>TGA</b>	Análise termogravimétrica
<b>ua</b>	Unidades de absorvância
<b>UE</b>	União Europeia
<b>UFP</b>	Unidade fenilpropano
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>W</b>	Teor de humidade
<b>Z</b>	Teor de cinzas
<b>δ</b>	Desvio químico (ppm)
<b>β<sub>002</sub></b>	Largura a meia altura do reflexo do plano 002
<b>δ<sub>L</sub></b>	Parâmetro relacionado com a distorção da rede perpendicular à direcção
<b>η</b>	Viscosidade intrínseca
<b>η<sub>rel</sub></b>	Viscosidade relativa
<b>θ</b>	Ângulo
<b>θ<sub>máximo</sub></b>	Ângulo máximo
<b>θ<sub>002</sub></b>	Ângulo máximo do reflexo do plano 002
<b>θ<sub>040</sub></b>	Ângulo máximo do reflexo do plano 040

# Índice

<b>Símbolos e Abreviaturas.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
<b>1. O Sector Vitivinícola.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Enquadramento mundial e comunitário.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Subprodutos gerados no processo de vinificação.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Engaço da uva.....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Principais componentes do engaço.....	8
1.3.1.1 Celulose.....	8
1.3.1.2 Lenhina.....	11
1.3.1.3 Hemiceluloses.....	13
<b>1.4 Processos de obtenção de pasta celulósica.....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Processo kraft.....	16
1.4.2 Processo sulfito.....	18
1.4.3 Processo organosolv.....	19
1.4.3.1 Etanol.....	19
1.4.3.2 Ácido peracético.....	19
1.4.3.3 Metanol.....	21
1.4.3.4 Ácido acético.....	21
1.4.3.5 Ácido perfórmico.....	21
<b>1.5 Derivados de celulose.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Ésteres de celulose.....	23
1.5.1.1 Acetato de celulose.....	23
1.5.2 Éteres de celulose.....	26
1.5.2.1 Carboximetilcelulose.....	27
<b>Capítulo II. Materiais e Métodos.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Matéria-prima utilizada.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Análise química do engaço da uva e da matéria fibrosa isolada.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Determinação do teor de humidade.....	29
2.1.2 Determinação do teor de cinzas.....	30
2.1.3 Determinação do teor de extractáveis.....	30
2.1.4 Determinação de proteínas.....	31
2.1.5 Determinação de taninos.....	31
2.1.6 Determinação do teor de lenhina Klason.....	32
2.1.7 Determinação do teor de celulose ( <i>Kürscher e Höffer</i> ).....	33

2.1.8	Determinação do teor de hemiceluloses .....	33
2.1.9	Determinação de açúcares .....	33
2.1.10	Determinação dos conteúdos catiónicos (Ca, K, Mg, Na e Zn) .....	34
2.1.11	Isolamento da lenhina por acidólise .....	35
2.1.12	Oxidação com nitrobenzeno .....	35
2.1.13	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	36
2.1.14	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	36
2.1.15	Cromatografia de permeação em gel - GPC.....	37
2.1.16	Difracção de Raios-X .....	37
2.1.17	Análises térmicas.....	40
2.1.17.1	Análise termogravimétrica (TGA) .....	40
2.1.17.2	Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) .....	40
<b>2.2</b>	<b>Obtenção de matéria fibrosa (Pastas) .....</b>	<b>40</b>
2.2.1	Cozimento kraft.....	40
2.2.2	Cozimento oxidativo com ácido peracético (Pa).....	41
<b>2.3</b>	<b>Análise das pastas .....</b>	<b>41</b>
2.3.1	Determinação da viscosidade intrínseca.....	42
2.3.2	Determinação do teor de lenhina residual .....	42
2.3.2.1	Determinação da absorvidade molar ( $\epsilon$ ).....	43
<b>2.4</b>	<b>Modificação das pastas por acetilação parcial .....</b>	<b>43</b>
2.4.1	Determinação do grau de substituição.....	44
<b>Capítulo III. Resultados e Discussão .....</b>		<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>Caracterização química do engaço da uva.....</b>	<b>45</b>
3.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR .....	48
3.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS .....	50
3.3	Lenhina Klason .....	51
3.3.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR .....	51
3.3.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS .....	53
3.4	Isolamento e caracterização estrutural da celulose.....	55
3.4.1	Difracção de Raios -X .....	55
<b>4.</b>	<b>Caracterização estrutural da lenhina .....</b>	<b>57</b>
4.1	Caracterização estrutural da lenhina <i>in situ</i> .....	57
4.1.1	Oxidação com nitrobenzeno.....	57
4.2	Isolamento e caracterização da lenhina-dioxano .....	58
4.2.1	Isolamento da lenhina por acidólise .....	58
4.2.2	Caracterização estrutural da lenhina-dioxano .....	59
4.2.2.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR .....	59

4.2.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton - RMN de $^1\text{H}$ .....	60
4.2.2.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear a duas dimensões (COSY).....	62
4.2.2.4	Cromatografia de permeação de gel – GPC.....	64
<b>5.</b>	<b>Obtenção de material fibroso.....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização química da pasta.....</b>	<b>67</b>
5.1.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR.....	70
5.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS.....	71
<b>5.2</b>	<b>Modificação das pastas por acetilação parcial.....</b>	<b>72</b>
5.2.1	Caracterização química das pastas parcialmente acetiladas.....	73
5.2.1.1	Grau de substituição.....	73
5.2.1.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	74
5.2.1.3	Calorimetria diferencial de varrimento (DSC).....	75
5.2.1.4	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS.....	76
<b>Capítulo IV.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>79</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>.....</b>	<b>83</b>



## Índice de Figuras

Figura 1: Principais produtores mundiais de vinho [4].	3
Figura 2: Constituição de um cacho de uva [11].	5
Figura 3: Estrutura molecular da celulose [(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> ] na forma de 1,4-β-D-glucopiranosose [29].	9
Figura 4: Ligações inter e intra-moleculares nas cadeias de celulose [29].	10
Figura 5: I -Representação esquemática da célula unitária da celulose I (celulose nativa); II – planos da célula unitária celulose I [33, 34].	10
Figura 6: Álcoois precursores da lenhina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico [40].	11
Figura 7: Diferentes ligações entre unidades fenilpropano da lenhina [41].	13
Figura 8: O-Acetil-4-O-metilglucuronoxilana de uma folhosa [43].	14
Figura 9: Glucomananas de uma folhosa [43].	14
Figura 10: Arabino-4-O-metilglucuronoxilana de uma resinosa [43].	15
Figura 11: O-Acetilgalactoglucomananas de uma resinosa [43].	15
Figura 12: (a) - hidroxilação do anel aromático; (b) - desmetoxilação de estruturas aromáticas; (c) - abertura dos anéis aromáticos por Pa com a formação de ácidos mucónicos; (d) - quebra de ligação éter β-aril por adição eletrofílica de perácido; (e) - Formação de epóxidos [51-53].	20
Figura 13: Principais derivados de celulose.	22
Figura 14: Mecanismo de acetilação homogénea [56].	24
Figura 15: Estrutura da carboximetilcelulose [65].	27
Figura 16: Identificação das áreas cristalinas e amorfas no difractograma da celulose.	38
Figura 17: Espectro de FTIR do engaço da uva.	48
Figura 18: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C CP/MAS do engaço da uva.	50
Figura 19: Espectro de FTIR da lenhina Klason.	52
Figura 20: Espectro de RMN <sup>13</sup> C CP/MAS da lenhina Klason.	54
Figura 21: Difractograma da celulose isolada.	56
Figura 22: Produtos identificados por oxidação com nitrobenzeno. I- p-hidroxibenzaldeído; II- Vanilina; III- Siringaldeído.	57
Figura 23: Espectro de FTIR da lenhina-dioxano.	59
Figura 24: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da lenhina acetilada.	60
Figura 25: Espectro COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) da lenhina acetilada.	63
Figura 26: Cromatograma de permeação de gel da lenhina-dioxano.	64
Figura 27: Espectro do UV-VIS da pasta dissolvida na solução de cadoxeno.	69
Figura 28: Espectro de FTIR da pasta obtida por cozimento oxidativo com Pa.	70
Figura 29: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C CP/MAS da pasta obtida por cozimento oxidativo com Pa.	71

Figura 30: Curvas termogravimétricas para a pasta acetilada a 5 e 15 minutos, e para uma pasta kraft de <i>E. globulus</i> . .....	74
Figura 31: Curvas de DSC para as pastas acetiladas a 5 e 15 minutos.....	76
Figura 32: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C CP/MAS da pasta acetilada a 5 minutos. ....	77

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição dos subprodutos (Kg/hL) produzidos aquando da produção do vinho [2]. ...	6
Tabela 2: Composição química do engaço [7, 10, 12, 20, 21]. .....	7
Tabela 3: Composição mineral do engaço da uva [26]. .....	8
Tabela 4: Abundância de ligações nas folhosas e resinosas (número de ligações por 100 unidades C <sub>9</sub> ) [36, 40]. .....	12
Tabela 5: Terminologia associada à composição do licor branco no cozimento kraft [45-47]. .....	17
Tabela 6: Solubilidade e aplicações dos acetatos de celulose consoante o grau de substituição [56, 57]. .....	25
Tabela 7: Propriedades das pastas para a obtenção de acetatos de celulose [56, 60]. .....	25
Tabela 8: Condições operacionais utilizadas nos ensaios de cozimento kraft do engaço da uva. ....	41
Tabela 9: Condições utilizadas nos ensaios de cozimento pelo processo organosolv. ....	41
Tabela 10: Composição química do engaço da uva. ....	45
Tabela 11: Composição dos componentes catiónicos das cinzas obtidas do engaço. ....	46
Tabela 12: Composição média em monossacarídeos no engaço. ....	48
Tabela 13: Atribuições das bandas no infravermelho do engaço da uva [17-19, 37, 52, 78-80]. ....	49
Tabela 14: Atribuições dos desvios químicos no espectro de RMN de <sup>13</sup> C no estado sólido do engaço da uva [17, 79, 81]. .....	51
Tabela 15: Atribuições das bandas de FTIR da lenhina Klason [37, 52, 71, 77, 78, 80, 82, 84]. ....	53
Tabela 16: Atribuições dos sinais no espectro de RMN de <sup>13</sup> C no estado sólido da lenhina Klason [37, 38, 79, 85, 86]. .....	55
Tabela 17: Grau de cristalinidade e dimensões do cristalito. ....	56
Tabela 18: Compostos identificados por GC/MS, tempo de retenção, massa molecular e razão H:G:S. ....	58
Tabela 19: Atribuições dos principais sinais no espectro de RMN de <sup>1</sup> H da lenhina acetilada [37, 67, 90]. .....	61
Tabela 20: Ensaios realizados para a obtenção de pastas a diferentes concentrações de Pa, temperaturas, pH, e tempo de reacção. ....	65
Tabela 21: Composição química das pastas. ....	67
Tabela 22: Coeficientes de absorção de lenhinas residuais [70]. .....	69
Tabela 23: Atribuições das bandas no infravermelho da pasta [32, 94-96]. .....	71
Tabela 24: Atribuições dos sinais de RMN de <sup>13</sup> C CP/MAS da pasta obtida por cozimento oxidativo com Pa [81]. .....	72
Tabela 25: Grau de substituição (DS) para os diferentes tempos de acetilação da pasta. ....	73

Tabela 26: Atribuições dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS da pasta acetilada a 5 minutos [100-102].....	78
--	----

## Introdução

O sector vitivinícola em Portugal é um dos sectores mais representativos da economia agrícola, sendo por isso importante desenvolver estudos para a utilização dos seus subprodutos, uma vez que estes representam uma perda de recursos. O engaço da uva é um dos subprodutos obtidos no processo de vinificação e é o tema de estudo deste trabalho.

Os resíduos agrícolas de natureza lenhocelulósica surgem como possíveis soluções para a obtenção de produtos de maior valor económico, tais como: fibras têxteis, ração animal, energia renovável (combustíveis), resinas, filmes, materiais isolantes, pasta de papel, materiais de construção, entre outros [1].

A possibilidade de aproveitamento do engaço da uva na produção de pasta celulósica representa uma alternativa interessante para a valorização deste subproduto, que é vulgarmente aproveitado como combustível ou adubo [2]. O uso do engaço, como matéria-prima para a produção de pasta celulósica, acrescenta valor económico a um subproduto da vinificação e minimiza o seu impacto no ambiente.

Sendo Portugal um dos países a nível mundial com maior expressão no sector vitivinícola, onde a superfície vitícola atinge uma área total de 239 951 hectares de vinha, torna-se imprescindível gerir os resíduos resultantes dessa actividade [3].

O presente estudo pretende assim dar um contributo para o desenvolvimento do conhecimento científico relativo à composição química do engaço da uva e à utilização deste como fonte de novos materiais, contribuindo, deste modo, para um desenvolvimento equilibrado e sustentado da economia, bem como para a preservação do ambiente.

Este trabalho consistiu no estudo da composição química do engaço da uva e possíveis aplicações, encontrando-se dividido em quatro capítulos:

O Capítulo I consiste na revisão bibliográfica, na qual é efectuado um enquadramento mundial e comunitário do sector vitivinícola, uma caracterização sumária dos subprodutos da vinificação, uma caracterização química sumária do engaço da uva e uma descrição dos seus principais componentes (lenhina, celulose e hemiceluloses). Neste capítulo também se aborda os diferentes processos de obtenção de pasta celulósica, como o processo kraft, o processo organosolv e processo sulfito, assim como os principais derivados da celulose (ésteres e éteres de celulose).

No Capítulo II procede-se à descrição dos métodos e técnicas utilizados na caracterização química do engaço, no isolamento e na caracterização estrutural da lenhina, na obtenção de pasta celulósica e na acetilação dessas pastas.

No Capítulo III são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Este capítulo encontra-se dividido em três partes. Na primeira parte apresentam-se os resultados referentes à composição química do engaço (Capítulo III, secção 3). Na segunda e terceira parte deste capítulo encontram-se os resultados referentes à caracterização estrutural da lenhina (Capítulo III, secção 4) e à obtenção do material fibroso e posterior modificação química das pastas por acetilação parcial (Capítulo III, secção 5).

Por fim, no Capítulo IV são apresentadas as conclusões finais deste trabalho.

## Capítulo I. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo apresentar-se-á uma revisão bibliográfica, abordando assuntos referentes à cultura vitivinícola em Portugal e à caracterização e valorização dos subprodutos da vinificação. Igualmente se efectuará uma breve abordagem aos principais constituintes do engaço da uva, como a celulose, lenhina e hemiceluloses; a alguns processos de obtenção de pasta celulósica (kraft, sulfito e organosolv); e aos derivados de celulose (ésteres e éteres de celulose).

### 1. O Sector Vitivinícola

#### 1.1 Enquadramento mundial e comunitário

A cultura da vinha expande-se por todos os Continentes, sendo que a União Europeia (UE) representa 60% da produção mundial de vinho. A Figura 1 apresenta os quinze principais países produtores mundiais de vinho, na qual podemos verificar a presença de sete Estados-Membros da UE, entre os quais Portugal. Este, com uma produção anual de cerca de 7 milhões de hL de vinho, assume o décimo lugar no *ranking* mundial e o quinto lugar a nível europeu, apenas ultrapassado pela Itália, França, Espanha e Alemanha [4].

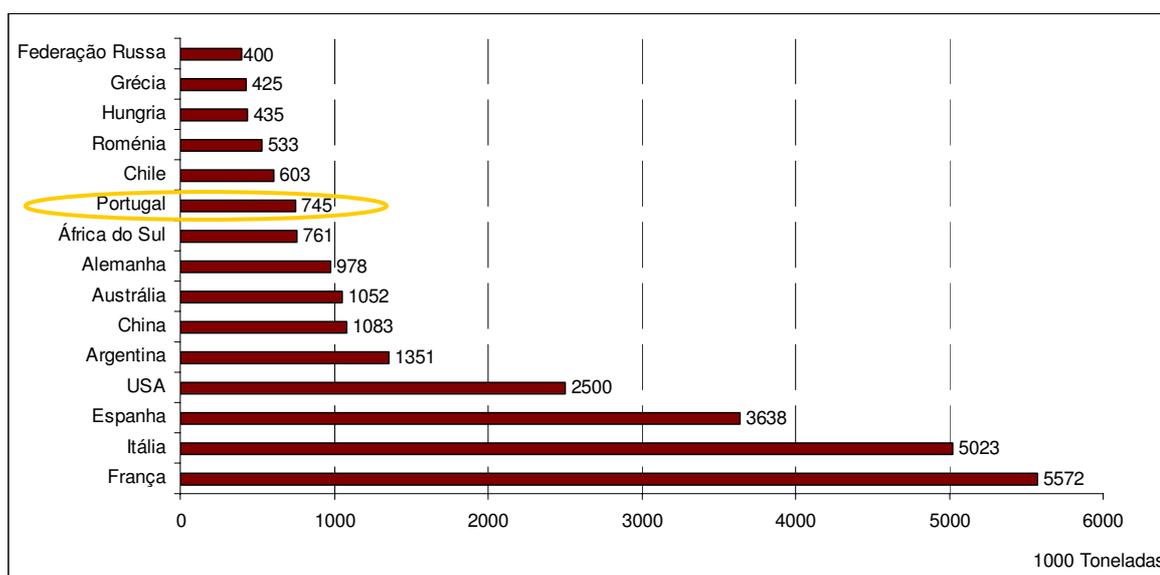


Figura 1: Principais produtores mundiais de vinho [4].

O sector vitivinícola da União Europeia utiliza 3,4 milhões de hectares, cerca de 2% da Superfície Agrícola Utilizada (SAU) da UE, representando por isso uma actividade económica fundamental, nomeadamente para o emprego e receitas de exportação [5]. A União Europeia lidera o mercado mundial do vinho em termos de área (45% da superfície vitivinícola), de produção (60%) e de consumo (60%) [4].

A vitivinicultura em Portugal é uma actividade agrícola de referência na nossa economia. A cultura da vinha ocupa uma área de 239 951 ha dos 648 863 ha de SAU, onde a SAU representa cerca de 42% da superfície total de Portugal e a população trabalhadora no sector primário representa cerca de 11% da população activa [6].

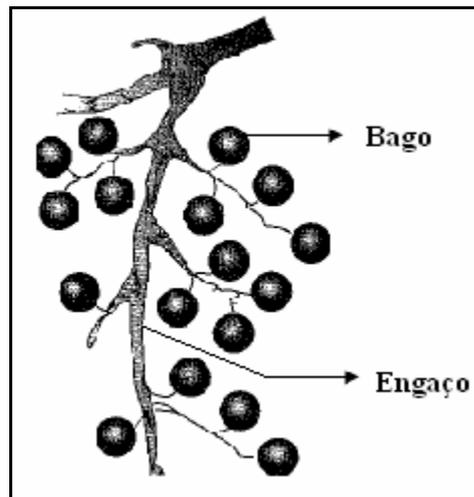
O sector vitivinícola em Portugal é um dos sectores mais representativos da economia agrícola (cerca de 14% da produção agrícola no triénio 2002-2004), tornando-se portanto indispensável gerir os resíduos resultantes dessa actividade [4]. O tratamento de subprodutos da vinificação está a merecer cada vez maior atenção, seja com vista ao seu aproveitamento e/ou à despoluição do ambiente. Nesse sentido, em Janeiro de 2007, a Comissão Europeia apresentou um projecto de regulamento que prevê uma reforma urgente na Organização Comum de Mercado (OCM vitivinícola).

A nova OCM vitivinícola propõe medidas ao nível do ambiente, nomeadamente no que respeita à eliminação de subprodutos da produção de vinho, aos efeitos no solo (erosão, compactação, perda de matéria orgânica), à utilização intensa de produtos fitofarmacêuticos, ao recurso crescente à irrigação em certas regiões, entre outros problemas causados pela produção vitivinícola [5].

De um modo geral, as actividades agro-industriais, incluído a indústria vitivinícola, produzem uma elevada quantidade de subprodutos que, na maioria das vezes, são pouco aproveitados, constituindo enormes desperdícios. Normalmente, estes desperdícios não são perigosos, mas o elevado conteúdo de matéria orgânica e o facto de a produção ser sazonal, pode contribuir para potenciais problemas de poluição, nomeadamente no que diz respeito à carência química e biológica de oxigénio [7].

## 1.2 Subprodutos gerados no processo de vinificação

O cacho de uva é constituído pela parte lenhosa e pelos bagos (Figura 2). A parte lenhosa corresponde ao engaço e constitui o canal de alimentação possuindo também a função de suporte do bago. Os bagos representam 91 a 97% do peso do cacho e são constituídos pelas pelúcidas, pelas grainhas ou sementes, e pela polpa, tecido frágil de grandes células tumefactas cuja ruptura produz sumo, ou mosto [8-10].



**Figura 2:** Constituição de um cacho de uva [11].

A pelúcida é a parte externa do bago e representa 7 a 12% do peso do bago [10]. A pelúcida após desidratação e separação das grainhas e engaço denomina-se de folhelho. O folhelho representa 40-50 % do peso do bagaço fresco e é constituído principalmente por celulose (20-27%), proteínas (10-15,6%), taninos (0,4-3%), matérias minerais (2,7-8,9%) e matérias gordas (5,2-7,8%) [2].

As grainhas ou sementes influenciam o crescimento do bago e representam 1 a 7% do peso do bago [10]. As grainhas são constituídas por, água (25-45%), taninos condensados (4-10%), matérias minerais (2-4%), substâncias gordas (15-20%) e celulose (30-33%) [2, 10, 12]. Um hectolitro de vinho corresponde a uma quantidade de sementes susceptíveis de produzir 0,5 litros de óleo [12]. A valorização da grainha passa pela extracção do seu óleo (cerca de 15%) [13].

Do processo de vinificação resulta o vinho, bem como os seus subprodutos. Sendo Portugal um país onde a produção de vinho atinge uma apreciável expressão económica, os subprodutos desta actividade são, em grande parte, insuficientemente aproveitados.

Designam-se por subprodutos da vinificação, os produtos resultantes das diferentes operações decorrentes da tecnologia de fabrico do vinho, sendo eles: o bagaço (constituído pelo engaço, folhelho e grainha), a borra e o sarro [14]. A Tabela1 apresenta a composição dos subprodutos gerados na produção do vinho. O autor refere que 100 litros de vinho originam 31 ou 25 Kg de subprodutos, consoante se tratar de vinificação em branco ou em tinto [2].

**Tabela 1:** Composição dos subprodutos (Kg/hL) produzidos aquando da produção do vinho [2].

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

O Regulamento (CE) de 1493/99, que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola, define o bagaço como um resíduo resultante da prensagem das uvas frescas, que pode ser fermentado, denominando-se de bagaço tinto ou fermentado, ou pode ser resultante da elaboração de vinhos de “bica aberta”, isto é, não fermenta com os mostos, denominando-se de bagaço doce ou fresco [2, 15]. O bagaço corresponde em média 9 a 11% do peso das uvas, para bagaços desengaçados, e 12 a 14% para bagaços com engaço. Estes valores podem variar bastante devido a inúmeros factores como: a variedade das castas; estado sanitário das uvas; e intensidade da prensagem [14].

O bagaço é constituído principalmente por: água (cerca de 60-70%), vinho e borras (sendo estes dependentes da prensagem); álcoois (principalmente o etanol, e também o metanol, glicerol e álcoois superiores); aldeídos, ésteres, ácidos voláteis, polifenóis e taninos, proteínas, celulose, pectinas, sais minerais e resíduos de açúcar [2].

O bagaço da uva como subproduto da vinificação tem diversas aplicações. Embora seja, quase exclusivamente, usado para destilaria, é muitas vezes aproveitado como adubo, complemento da alimentação do gado (ração), e na extracção do óleo das grainhas [13, 14, 16]. Recentes estudos demonstram que o bagaço da uva pode ser utilizado na remoção de metais pesados de águas residuais [17-19], assim como na extracção antioxidantes [20].

### 1.3 Engaço da uva

O engaço é a ramificação mais longa que forma o eixo principal da inflorescência, enquanto que as ramificações mais curtas apoiam o bago. O engaço na maturidade representa 3 a 9 % do peso do cacho, e é rico em taninos [11, 12].

A operação da retirada do engaço da uva designa-se por desengace ou desengaçamento e é efectuada por uma desengaçadeira. Esta operação faz com que o engaço não participe no processo produtivo do vinho, uma vez que o engaço pode transmitir ao vinho sabores amargos e adstringentes, desagradáveis ao paladar [21].

O engaço modifica a composição do vinho. Contém água e pequena quantidade de açúcares, o que provoca uma diminuição do conteúdo alcoólico. O engaço é rico em potássio e apresenta baixa acidez. O desengaçamento aumenta a acidez do mosto e o teor alcoólico [21].

O engaço, como subproduto da vinificação, pode ter várias valorizações, tais como: compostagem [22, 23]; remoção de metais pesados de efluentes líquidos [17, 19]; recuperação de antioxidantes naturais [24, 25]; e combustível (devido ao seu poder calorífico na ordem das 2000 a 2500 Kcalorias/Kg) [2].

No que se refere à composição química do engaço da uva a literatura é relativamente escassa. Os dados respeitantes à composição química do engaço da uva estão reunidos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Composição química do engaço [7, 10, 12, 20, 21].

<b>Componente</b>	<b>Percentagem (%)</b>
Água	70-80
Cinzas	≈ 7,6
Celulose	24-38
Resíduo insolúvel em ácido	23-34
Lenhina Insolúvel	≈ 2,2
Hemiceluloses	14-15
Matérias minerais	2-3
Taninos condensados	2-7

A compostagem de resíduos orgânicos surgiu como uma forma de valorizar os resíduos e evitar custos de deposição. Deste modo, o engaço da uva é muitas vezes utilizado no processo de compostagem para a fertilização dos solos devido ao seu elevado conteúdo em potássio e noutros componentes minerais [22, 26]. A Tabela 3 apresenta-nos os principais minerais encontrados no engaço da uva.

**Tabela 3:** Composição mineral do engaço da uva [26].

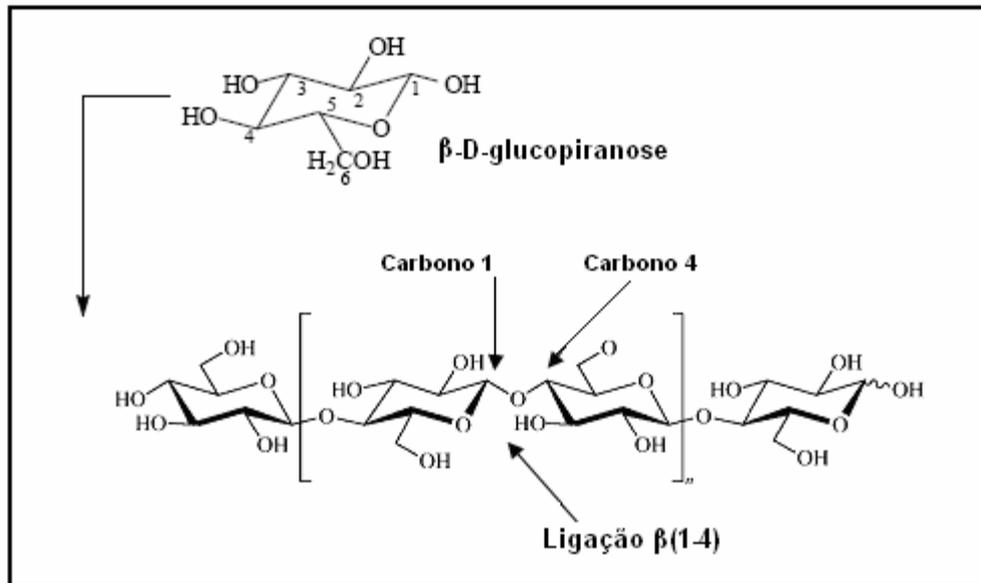
<b>Parâmetro</b>	<b>g/Kg de engaço</b>
Potássio (K)	32,4
Sódio (Na)	0,56
Cálcio (Ca)	9,31
Magnésio (Mg)	1,70

### 1.3.1 Principais componentes do engaço

Como averiguou-se na secção anterior o engaço da uva é constituído por vários componentes. No entanto, sendo um material de natureza lenhocelulósica a celulose, a lenhina e as hemiceluloses são os componentes mais abundantes no engaço.

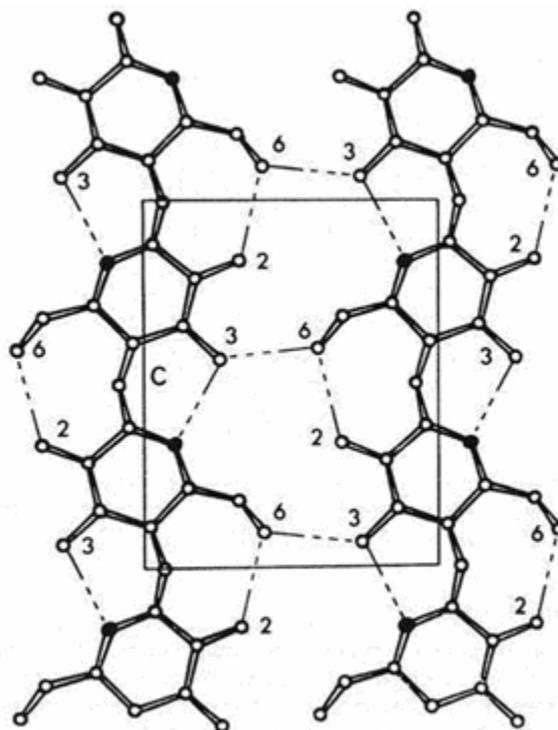
#### 1.3.1.1 Celulose

A celulose é o mais abundante polímero natural e encontra-se na parede celular das células vegetais. É um polissacarídeo linear composto por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ , formando unidades de celobiose, a menor unidade de repetição na celulose (Figura 3) [27]. O grau de polimerização da celulose na madeira ronda as 10 000 unidades de D-glucopiranosose, podendo atingir as 15 000 unidades no algodão [27, 28]. A denominação  $\beta(1-4)$  descreve o local onde ocorre a ligação glicosídica (entre o carbono 1 e o carbono 4) e a configuração do átomo de oxigénio entre unidades de glucose adjacentes [28].



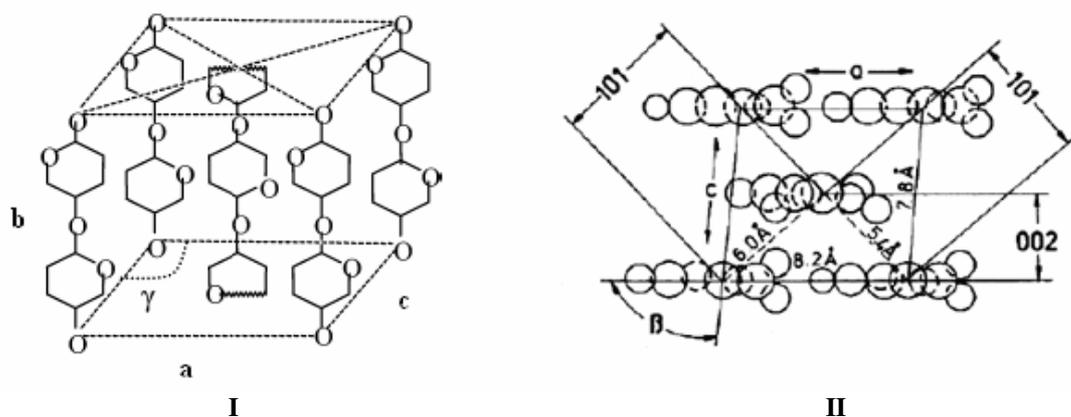
**Figura 3:** Estrutura molecular da celulose  $[(C_6H_{10}O_5)_n]$  na forma de 1,4- $\beta$ -D-glucopiranosose [29].

Cada unidade de D-glucopiranosose apresenta três grupos hidroxilos nas posições C-2 e C-3 (OH secundários) e na posição C-6 (OH primário) [30]. Os grupos hidroxilos são responsáveis pelo comportamento químico da celulose, e conferem à celulose elevada aptidão para formar ligações por pontes de hidrogénio intra e inter-moleculares (Figura 4). As ligações intra-moleculares são ligações por pontes de hidrogénio entre grupos OH de unidades de glucose adjacentes da mesma molécula de celulose, e dão-se entre o grupo OH do C-3 e o oxigénio do C-5, e entre o grupo OH do C-6 e o grupo OH do C-2. Estas ligações são responsáveis por uma certa rigidez das cadeias unitárias. Por sua vez, as ligações inter-moleculares são ligações por pontes de hidrogénio entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose. Estas ligações efectuam-se entre o grupo OH do C-6 e o grupo OH do C-2, e são responsáveis pela formação das estruturas supramoleculares [29]. Devido à forte tendência da celulose para formar de ligações de hidrogénio inter e intra-moleculares, as cadeias de celulose agregam-se em microfibrilas. As microfibrilas caracterizam-se por possuírem regiões altamente organizadas (cristalinas), que alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas são depois agregadas em fibrilas e finalmente em fibras de celulose [29]. As microfibrilas quando associadas a outros componentes conferem rigidez e resistência à planta. Na madeira as microfibrilas estão embebidas numa matriz de polissacarídeos e lenhina [31].



**Figura 4:** Ligações inter e intra-moleculares nas cadeias de celulose [29].

A difração de raios-X permite obter informação sobre a estrutura supramolecular da celulose e mostra-nos que esta pode adoptar diversas formas cristalinas (polimorfismos) [32]. A estrutura cristalina da celulose nativa (celulose I) pode ser descrita como uma célula unitária monoclinica que contém duas cadeias de celulose paralelas [30]. De acordo com o modelo de Meyer-Mark-Misch a célula unitária monoclinica possui três eixos de comprimentos diferentes e um ângulo diferente de  $90^\circ$  (Figura 5) [33].



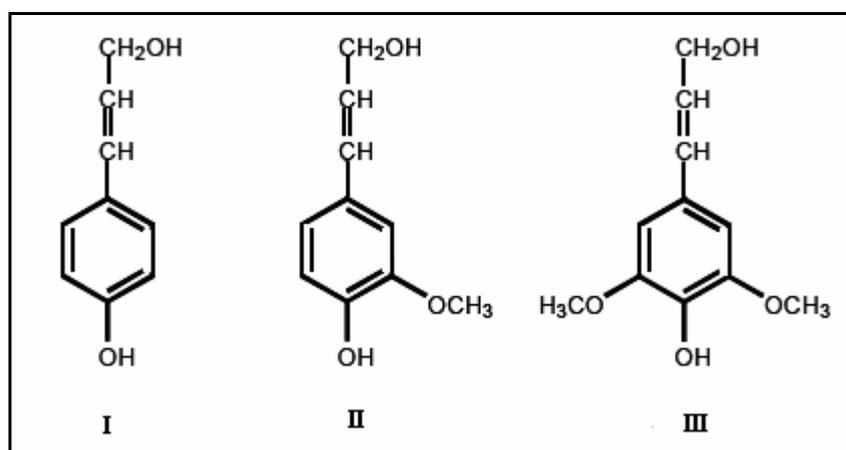
**Figura 5:** I -Representação esquemática da célula unitária da celulose I (celulose nativa); II – planos da célula unitária celulose I [33, 34].

Estudos posteriores de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS e de difração de raios-X demonstraram que celulose I é, predominantemente, composta por uma mistura de duas formas polimórficas: celulose  $\text{I}_\alpha$  e  $\text{I}_\beta$  [32, 34]. A celulose  $\text{I}_\alpha$  possui uma célula unitária triclínica, enquanto que a celulose  $\text{I}_\beta$  possui uma célula unitária monoclínica [34, 35]. Acredita-se, no entanto, que estes dois domínios cristalinos coexistem nas microfibrilas em diferentes rários, dependendo da sua origem [32].

### 1.3.1.2 Lenhina

A palavra lenhina deriva do latim *lignum*, que significa madeira. A lenhina é um dos principais componentes vasculares das plantas e é o segundo polissacarídeo natural mais abundante no reino vegetal [36]. A lenhina tem um papel preponderante no transporte de água, nutrientes e metabólitos. Confere rigidez à parede celular e está intimamente ligada à celulose e hemiceluloses, facultando assim uma estrutura dotada de resistência mecânica. A lenhina também protege os tecidos contra o ataque de microorganismos [35, 37, 38].

A lenhina da madeira possui uma estrutura muito complexa. É um heteropolímero derivado de três álcoois cinamílicos precursores, que diferem entre si segundo o grau de metoxilação: o álcool *p*-cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico (Figura 6) [39]. Estes álcoois precursores formam as unidades fenilpropano que compõem a lenhina: hidróxifenilo (H), guaiacilo (G) e seringilo (S). Sendo que o álcool *p*-cumarílico é o precursor das unidades H, o álcool coniferílico é o precursor das unidades G e o álcool sinapílico é o precursor das unidades S [40].



**Figura 6:** Álcoois precursores da lenhina: (I) álcool *p*-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico [40].

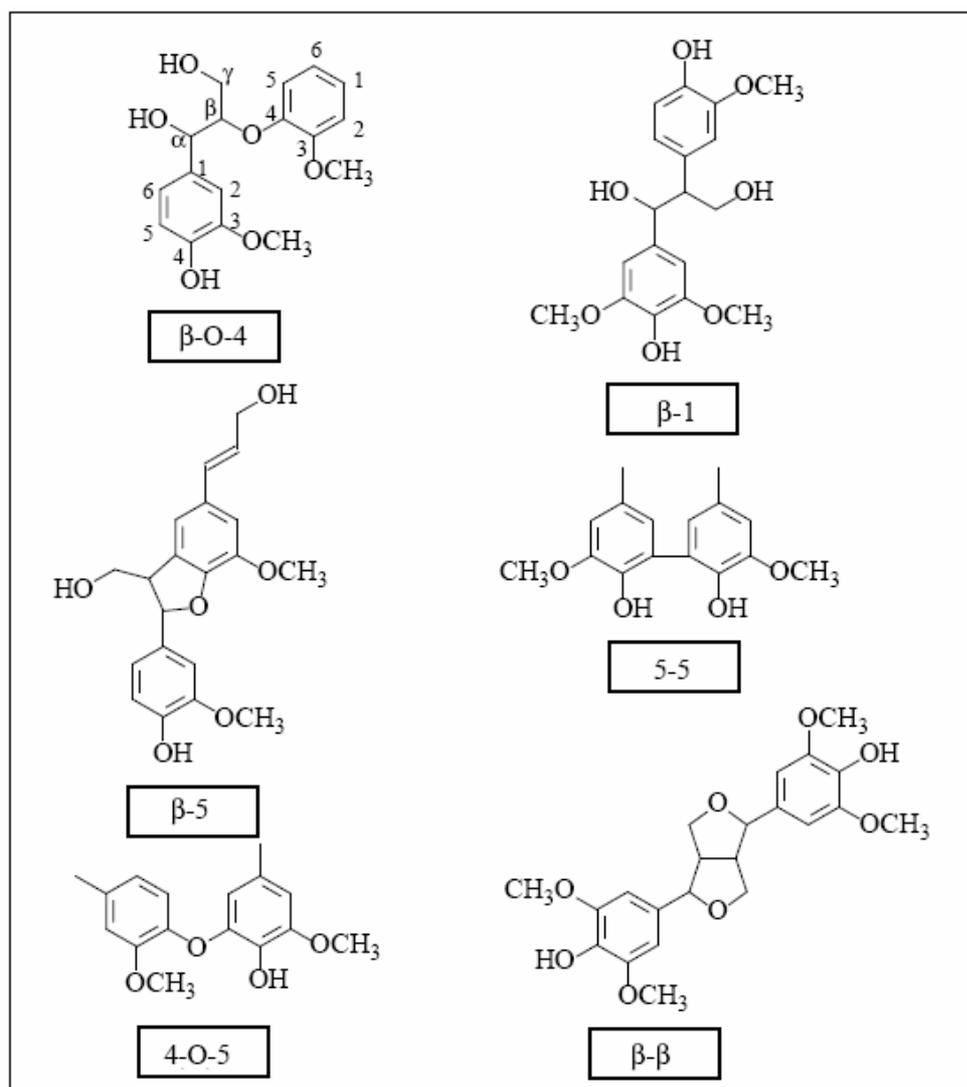
A abundância relativa de unidades S, G e H, varia significativamente de espécie para espécie. A madeira de resinosas é principalmente constituída por unidades guaiacilo (G), enquanto que a madeira de folhosas é constituída por unidades G e S [40]. As unidades do tipo seringilo (S), com dois grupos metóxilos nas posições 3 e 5 do anel aromático, são, normalmente, mais reactivas do que as estruturas do tipo guaiacilo (G) (apenas um grupo metóxilo em C-3) [33].

O processo pelo qual as unidades fenilpropano se unem umas às outras, através de reacções de acoplamento radicalar, denomina-se de lenhificação [39]. As unidades fenilpropano encontram-se ligadas umas às outras por ligações carbono-carbono ou ligações éter ( $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ , etc.) (Figura 7) [37, 41]. As ligações éter (C-O-C) são as mais dominantes, aproximadamente dois terços, e o conhecimento detalhado acerca das ligações é uma mais valia para a compreensão das reacções de degradação da lenhina em processos de produção de pasta e branqueamento [40]. Na Tabela 4 apresentam-se as abundâncias dos diferentes tipos de ligações na madeira de folhosas e resinosas [36, 40].

**Tabela 4:** Abundância de ligações nas folhosas e resinosas (número de ligações por 100 unidades C<sub>9</sub>) [36, 40].

Ligações	Resinosas	Folhosas
$\beta$ -O-4	40-50	50-60
$\alpha$ -O-4	6-8	4-6
$\beta$ -5	9-15	2-6
$\beta$ - $\beta$	8-14	6-15
$\beta$ -1	2-5	2-3
5-5	8-18	2-5
4-O-5	3-4	3-8

A reactividade da lenhina também é determinada pela presença de grupos funcionais ligados ao esqueleto fenilpropano. Entre estes grupos temos: os grupos metóxilos, hidroxilos alifáticos, hidroxilos fenólicos e grupos caboxílicos [40].



**Figura 7:** Diferentes ligações entre unidades fenilpropano da lenhina [41].

### 1.3.1.3 Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos que se encontram associados à celulose. Ao contrário da celulose, as hemiceluloses são amorfas, sendo mais facilmente atingidas pela maioria dos agentes químicos e apresentam cadeias mais curtas e ramificadas. As hemiceluloses representam 20-30% da madeira, e o seu grau de polimerização ronda os 200-300 unidades [29, 42].

As hemiceluloses são constituídas por várias unidades de monossacarídeos como a D-glucose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-ramnose e o ácido 4-O-metil-D-glucurónico. As cadeias de hemiceluloses podem ser constituídas

predominantemente por único açúcar, como é o caso das xilanas, ou por dois ou mais açúcares [42].

As hemiceluloses de resinosas e folhosas diferem quanto à natureza e abundância relativa. As hemiceluloses predominantes nas folhosas são as glucuronoxilanas e em pequena proporção as glucomananas. Nas resinosas, as hemiceluloses maioritárias são as galactoglucomananas e em menor quantidade as arabinoglucuronoxilanas [42].

As glucuronoxilanas, representam 15 a 30% das hemiceluloses das folhosas. As glucuronoxilanas são constituídas por uma cadeia principal de unidades de xilopiranoses unidas por ligações do tipo  $\beta(1-4)$ , parcialmente substituídas em C-2 pelo o ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurônico (Figura 8) [43]. As glucuronoxilanas também são substituídas em C-2 e C-3 por grupos acetilos. A quantidade de grupos acetilos varia entre 8-17%, correspondendo aproximadamente a 3,7-7 grupos acetilo por 10 unidades de D-xilose [42].

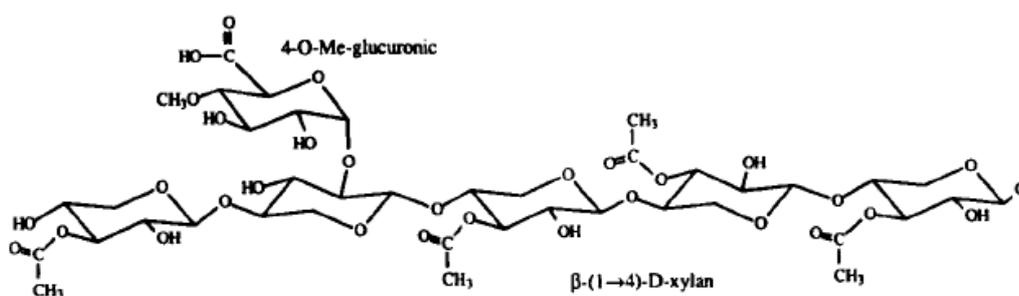


Figura 8: O-Acetil-4-O-metilglucuronoxilana de uma folhosa [43].

As glucomananas são pouco abundantes, correspondendo a 2 a 5 % das hemiceluloses das folhosas. As glucomananas possuem a mesma estrutura linear das galactoglucomananas, com a exceção de não possuírem substituintes na cadeia principal, sendo por isso um polímero totalmente linear (Figura 9). A razão de glucose e manose é de aproximadamente 1:2, respectivamente. As glucomananas são muito sensíveis às condições ácidas, sendo facilmente despolimerizadas [29, 42].

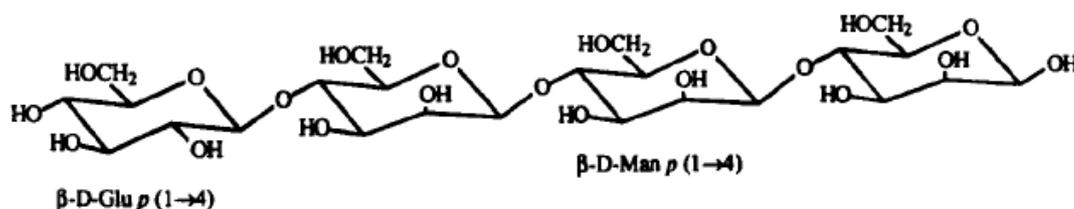


Figura 9: Glucomananas de uma folhosa [43].

As arabinoglucoronoxilanas correspondem a 5 a 10% das hemiceluloses das resinosas. A cadeia principal é constituída apenas por unidades de xilopirranose unidas por ligações do tipo  $\beta(1-4)$ . Encontram-se substituições em C-2 pelo ácido  $\alpha$ -D-metil glucorónico ( $\alpha$ -D-Me-glcA) unido por ligações  $\alpha(1-2)$ , e em C-3 pelo  $\alpha$ -arabinofuranose ( $\alpha$ -Araf) unido por ligações  $\alpha(1-3)$  (Figura 10) [29].

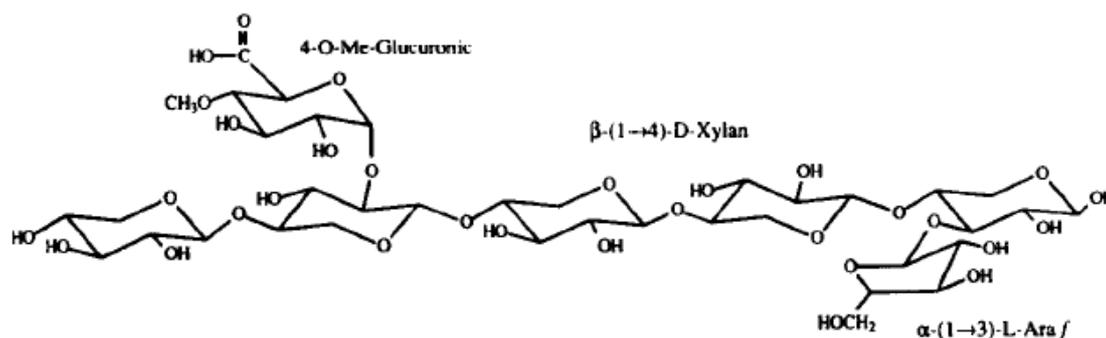


Figura 10: Arabino-4-O-metilglucuronoxilana de uma resinosa [43].

As galactoglucomananas representam cerca de 20 % das hemiceluloses das resinosas. A cadeia principal é constituída por unidades de glucose e manose unidas por ligações do tipo  $\beta(1-4)$ , substituída em C-6 por unidades de  $\alpha$ -D-galactopirranose. A razão entre as unidades de galactose, glucose e manose é de 1:1:3, respectivamente [42]. A solubilidade das galactoglucomananas depende da razão entre as unidades de manose e de glucose e da distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia principal (Figura 11) [29].

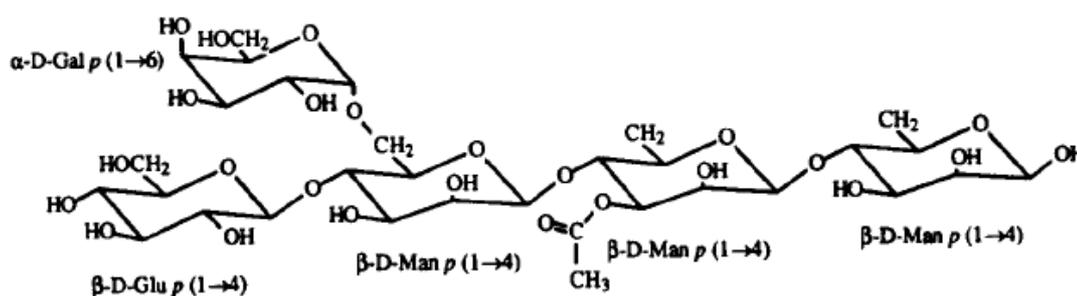


Figura 11: O-Acetilgalactoglucomananas de uma resinosa [43].

Para além das galactoglucomananas e das arabinoglucoronoxilanas, as resinosas contêm outros polissacarídeos presentes em menores quantidades, como o amido e substância pécicas. As substâncias pécicas mais comuns são as ramnogalacturanas, as arabinanas, galactanas e arabinogalactanas. As unidades mais comuns nos polissacarídeos

pécticos são o ácido D-galactorónico, a D-galactose, L-arabinose e a L-ramnose. A maioria das pectinas são polissacarídeos solúveis em água quente ou ácidos diluídos [29, 44].

## **1.4 Processos de obtenção de pasta celulósica**

A pasta celulósica é utilizada principalmente para a indústria do papel mas também para a obtenção de derivados de celulose. Os processos de obtenção de pasta têm como objectivo a separação das fibras, que podem ser realizados por processos meramente químicos ou mecânicos, ou pela combinação deste dois processos. Dependendo do processo utilizado podemos ter pastas químicas, semi-químicas, químico-mecânicas e pastas mecânicas [45].

Os principais processos químicos de produção de pasta são o processo kraft e o processo ao sulfito. Estes consistem no cozimento das aparas de madeira com químicos apropriados, a elevada temperatura e pressão. O objectivo é degradar e dissolver a lenhina das fibras, promovendo a separação das fibras. Em termos, práticos os métodos químicos, para além de removerem a maior parte da lenhina, também degradam e dissolvem uma parte das hemiceluloses e da celulose, o que faz com que a produção de pasta, pelos métodos químicos, seja mais baixa relativamente aos processos mecânicos [46].

### **1.4.1 Processo kraft**

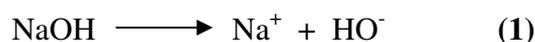
O processo soda foi o primeiro processo químico de obtenção de pasta. Este processo utiliza uma forte solução alcalina de hidróxido de sódio para deslenhificar as aparas de madeira. Carl S. Dahl modificou o processo soda (que utiliza NaOH como químico activo) com a introdução de sulfato de sódio no sistema de cozimento, denominando-o de processo kraft. O processo kraft é muitas vezes referido como processo ao sulfato, devido à presença de sulfato de sódio na sua composição química [46].

O cozimento kraft é realizado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) e de sulfureto de sódio (Na<sub>2</sub>S), denominada de licor branco. A terminologia associada à composição do licor branco é apresentada na Tabela 5, na qual, todas as substâncias químicas são calculadas como equivalentes de Na<sub>2</sub>O [45].

**Tabela 5:** Terminologia associada à composição do licor branco no cozimento kraft [45-47].

Parâmetro	Definição
Alcalinidade Total (g/L como Na <sub>2</sub> O)	[NaOH] + [Na <sub>2</sub> S] + [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] + [Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]
Alcalinidade Activa (g/L como Na <sub>2</sub> O)	[NaOH] + [Na <sub>2</sub> S]
Alcalinidade Efectiva (g/L como Na <sub>2</sub> O)	[NaOH] + ½ [Na <sub>2</sub> S]
Índice de Sulfureto ou Sulfidez (%)	[Na <sub>2</sub> S] / ([NaOH] + [Na <sub>2</sub> S]) × 100
Grau de redução (%)	[Na <sub>2</sub> S] / ([Na <sub>2</sub> S] + [Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]) × 100

Os componentes activos no licor de cozimento ou licor branco são o ião hidróxido (HO<sup>-</sup>) e o ião hidrogenosulfureto (HS<sup>-</sup>) originados a partir do NaOH e Na<sub>2</sub>S, de acordo com as seguintes equações [45]:



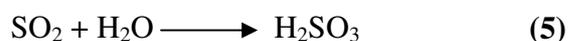
A presença de iões hidrogenosulfuretos, em meio alcalino, aceleram a degradação e a dissolução da lenhina, sem aumentar a dissolução da celulose, o que faz com que o tempo de exposição das aparas de madeira em meio alcalino seja menor em relação ao processo “à soda”, reduzindo a degradação dos polissacarídeos e, conseqüentemente, produzindo pastas de melhor qualidade [45, 47]. Os iões S<sup>2-</sup> e HS<sup>-</sup> são altamente nucleofílicos, comparativamente com os iões HO<sup>-</sup>, e reagem com a lenhina através da quebra das ligações éter. A quebra destas ligações provocam o aumento da solubilidade dos fragmentos de lenhina devido á libertação de grupos hidroxilos fenólicos [45].

O processo kraft envolve a digestão das aparas de madeira, a elevada temperatura (150-170°C) e pressão, onde a lenhina é dissolvida no licor branco. A temperatura de cozimento é mantida à temperatura máxima durante várias horas. A maior parte da deslenhificação ocorre durante o cozimento à temperatura máxima [45]. Após a digestão o material denominado de “pasta crua” é descarregado no *blow tank*, onde as aparas entumecidas são desintegradas em fibras. Seguidamente a pasta é lavada com água e crivada para remover impurezas sólidas e aparas não cozinhadas [48].

### 1.4.2 Processo sulfito

O processo sulfito é um processo químico de produção de pasta, que utiliza uma mistura de ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) e ião bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) para solubilizar a lenhina. O ácido sulfuroso combina-se com a lenhina para formar sais de ácido lenhosulfónico, que são solúveis no licor de cozimento. A base química para o bissulfito pode ser os iões  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , ou  $\text{Ca}^{2+}$  [46, 49].

O licor de cozimento é normalmente preparado pela queima de enxofre para produzir  $\text{SO}_2$  (equação 4) que é posteriormente dissolvido em água de modo a obter ácido sulfuroso (equação 5)[49]:



Antes do enxofre ser oxidado e formar  $\text{SO}_2$  é manipulado acima dos  $160^\circ\text{C}$ , visto que a essa temperatura se apresenta na forma líquida e assim é mais facilmente transportado. Durante a combustão do enxofre a  $1000^\circ\text{C}$ , a quantidade de oxigénio deve ser cuidadosamente regulada de modo a evitar a formação de  $\text{SO}_3$ , que quando dissolvido em água origina ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). O gás  $\text{SO}_2$  é arrefecido rapidamente antes da reacção com a água [49].

O processo de cozimento começa com uma fase de impregnação. Esta fase envolve a penetração do líquido nas cavidades da madeira e a difusão dos químicos de cozimento. A taxa de penetração ocorre rapidamente e depende do gradiente de pressão, enquanto que a difusão é controlada pela concentração das espécies químicas dissolvidas e tem lugar mais lentamente. A penetração é influenciada tanto, pela distribuição do tamanho dos poros, como pelas forças capilares [45].

O processo sulfito apresenta algumas vantagens, face ao processo kraft, tais como: a pasta resultante é mais facilmente branqueada e refinada e tem um maior rendimento. As desvantagens deste processo passam pelo facto de as pastas terem propriedades mecânicas mais fracas do que as pastas kraft [49].

### 1.4.3 Processo organosolv

O processo organosolv utiliza solventes orgânicos como meio reaccional na remoção da lenhina da madeira. Em 1992 dois processos organosolv estavam operando à escala industrial, e mais dois eram testados à escala piloto. Um dos processos à escala industrial era o processo *Organocell* (com base de metanol). O processo *Acetosolv* (com base de ácido acético) e *Milox* (com base de ácido perfórmico) foram testados à escala piloto.

Em geral, as propriedades de resistência das pastas organosolv são inferiores às das pastas kraft correspondentes. Porém, estas propriedades podem ser melhoradas por tratamento com soluções aquosas de sais inorgânicos [50].

#### 1.4.3.1 Etanol

O processo *Alcell* foi desenvolvido no Canadá e baseia-se na hidrólise dos componentes da madeira numa solução de etanol e água. As aparas de madeira são cozidas a altas temperaturas causando a clivagem de grupos acetil e a formação de ácido acético aquando da deslenhificação da madeira [46].

O solvente é reciclado e são recuperados produtos como lenhina, furfural e hidratos de carbono. O solvente preferido é o etanol aquoso (40-60 w -%). A temperatura de cozimento é de cerca de 180-210 °C e a pressão é 2-3,5 MPa [46, 50].

Este processo oferece várias vantagens em relação aos processos convencionais, tais como: pode operar, economicamente, a uma escala menor do que o processo de kraft; a qualidade da pasta é competitiva com as pastas convencionais; os custos de produção são mais baixos a qualquer escala do que os custos das pastas kraft ou sulfito; o processo isola a lenhina de uma forma relativamente pura; o processo *Alcell* é amigo do ambiente quando comparado com o processo kraft ou sulfito [50].

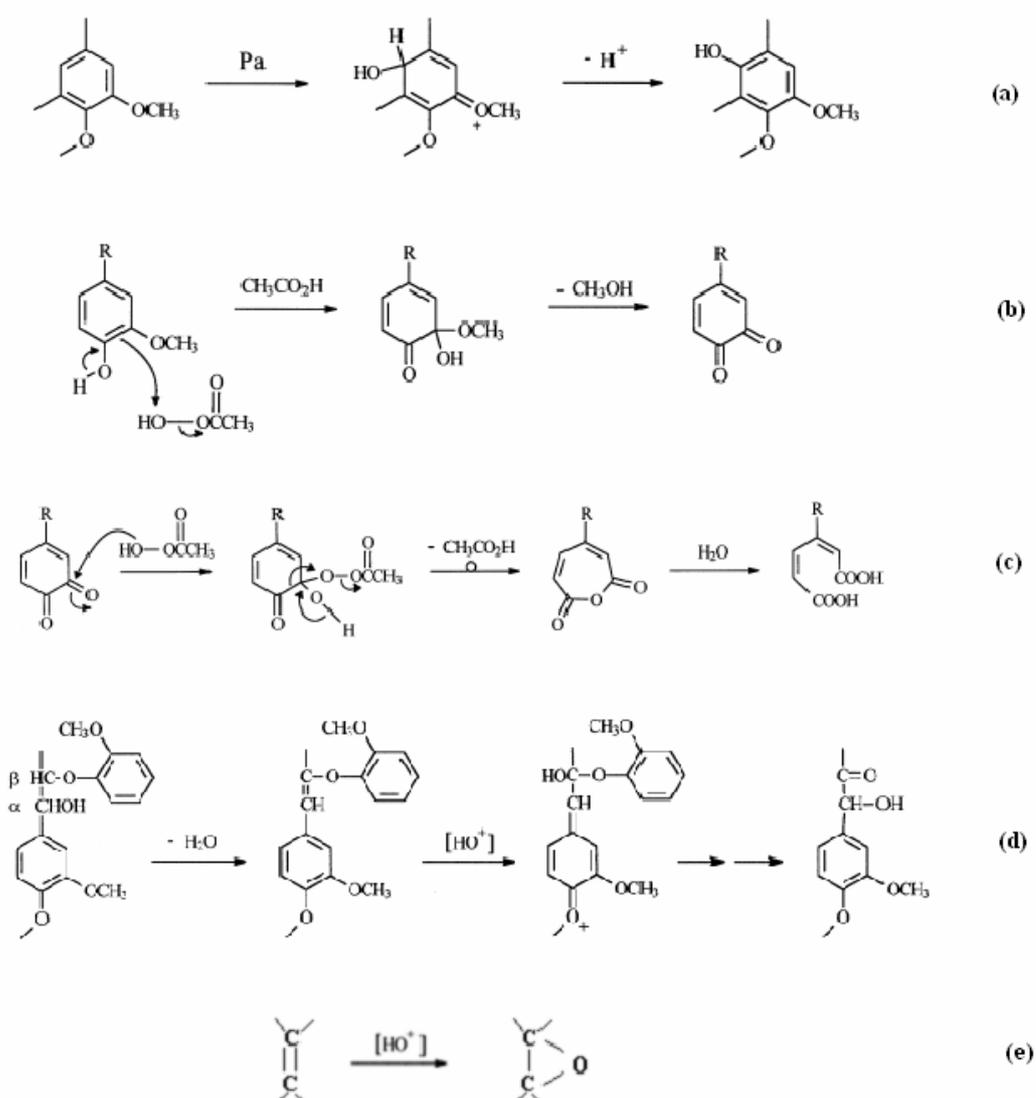
#### 1.4.3.2 Ácido peracético

O ácido peracético (Pa) é considerado um bom deslenhificador assim como um bom agente branqueador [51]. O ácido peracético pode ser preparado pela oxidação do ácido acético por peróxido de hidrogénio (equação 6). A percentagem de conversão de ácido

acético e peróxido de hidrogénio em Pa depende da proporção molar relativa entre os reagentes e das suas concentrações [52].



O comportamento da lenhina na presença de ácido peracético tem sido objecto de numerosos estudos. As reacções mais importantes entre as estruturas da lenhina e o ácido peracético estão apresentadas na Figura 12, e são as seguintes: hidroxilação do anel aromático por substituição electrofílica (a); desmetoxilação (b); abertura do anel aromático por Pa com a formação de ácidos mucónicos (c); clivagem das ligações éter  $\beta$ -aril (d); e epoxidação (e) [51-53].



**Figura 12:** (a) - hidroxilação do anel aromático; (b) - desmetoxilação de estruturas aromáticas; (c) - abertura dos anéis aromáticos por Pa com a formação de ácidos mucónicos; (d) - quebra de ligação éter  $\beta$ -aril por adição electrofílica de perácido; (e) - Formação de epóxidos [51-53].

### 1.4.3.3 Metanol

As propriedades de resistência da pasta produzida pelo processo *Organocell* (metanol) são semelhantes às da pasta kraft [46]. O processo *Organocell* tem dois estágios. No primeiro estágio, as aparas de madeira são cozidas com uma solução aquosa de metanol a 195°C. A maior parte dos açúcares e 20% da lenhina são dissolvidos neste estágio. O segundo estágio de cozimento é levado a cabo com uma solução de metanol-água-NaOH a 170°C. O metanol é recuperado por evaporação [50].

### 1.4.3.4 Ácido acético

Nimz e seus colaboradores patentearam um processo de produção de pasta com ácido acético, denominado de processo *Acetosolv*, onde a matéria-prima é cozinhada, sob refluxo, a 110°C, durante 2 a 5 horas com uma solução aquosa de 95% de ácido acético e 0,1% de HCl [53].

Durante a operação à escala piloto do processo *Acetosolv*, na Alemanha, ocorreram problemas de corrosão do equipamento. Deste modo, Gottlieb e seus colaboradores modificaram o processo *Acetosolv* e denominaram o novo processo de *Acetocell* [53]. As principais modificações foram: diminuição da solução aquosa de ácido acético de 95% para 80-90%; não utilizaram catalizador; aumentaram a temperatura para 170-190°C; e diminuiram o tempo de cozimento para 2-3 horas [50].

### 1.4.3.5 Ácido perfórmico

Um outro solvente orgânico utilizado na deslenhificação de materiais lenhocelulósicos é o ácido perfórmico ( $P_f$ ). O ácido perfórmico é formado pela mistura do ácido fórmico com peróxido de hidrogénio [54]. O processo de deslenhificação utilizando ácido fórmico e peróxido de hidrogénio é denominado de processo *Milox* [50]. O ácido perfórmico é responsável pela despolimerização e cisão das ligações éter  $\beta$ -O-4, no qual resulta a formação de grupos hidróxi-fenólicos hidrofílicos [54].

A reacção do ácido perfórmico com a lenhina envolve o ião electrofílico hidroxonium ( $HO^+$ ), formado de acordo com a equação 7.



O ataque electrofilico pelo  $\text{P}_f/\text{HO}^+$  na lenhina resulta na hidroxilação do anel aromático e formação de estruturas de ácido mucónico [54].

## 1.5 Derivados de celulose

O uso de fibras de celulose nos mais diversos materiais tem requerido especial atenção no meio científico. Este interesse tem crescido, principalmente pelas múltiplas vantagens associadas a estas fibras, tais como: a baixa densidade, o carácter bio-renovável, a disponibilidade ubíqua e as boas propriedades mecânicas [55].

Muitos dos derivados de celulose têm sido preparados, dentro dos quais se destacam os éteres e os ésteres de celulose. A Figura 13 apresenta-nos alguns dos mais importantes derivados de celulose. Cada unidade de  $\beta$ -D-glucopiranoose da cadeia de celulose tem três grupos hidroxilos reactivos, 2 secundários (HO-C2 e HO-C3) e um primário (HO-C6) [56]. Nos derivados de celulose, os grupos hidroxilos são substituídos por outros grupos. O grau de substituição (DS) é o termo dado ao número médio de grupos hidroxilos por unidade de  $\beta$ -D-glucopiranoose que foram substituídos. Deste modo, um derivado totalmente substituído terá um DS igual a 3. Os derivados comerciais usualmente possuem um DS inferior a 3, sendo que o é valor de DS que determina a sua finalidade [57].

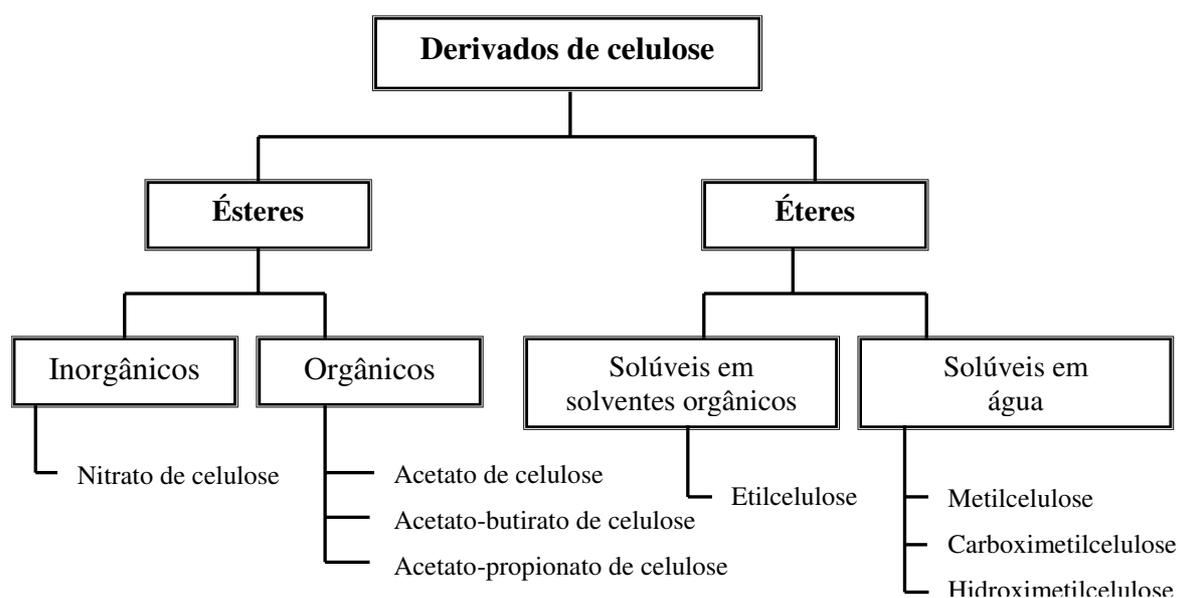


Figura 13: Principais derivados de celulose.

### 1.5.1 Ésteres de celulose

Os ésteres de celulose podem ser encontrados em numerosas aplicações, incluindo plásticos e revestimentos. Os ésteres de celulose podem ser orgânicos ou inorgânicos [58].

Os ésteres inorgânicos de celulose formam-se através da reacção da celulose com ácidos inorgânicos como o ácido nítrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico [56]. Por sua vez, os ésteres orgânicos de celulose formam-se geralmente pela reacção da celulose com ácidos orgânicos, anidridos ou ácido clorídrico [58]. O acetato de celulose é universalmente reconhecido como o mais importante éster orgânico de celulose devido à sua alargada aplicação na produção de filmes, componentes de extrusão, fibras, revestimentos, entre outros [57, 59].

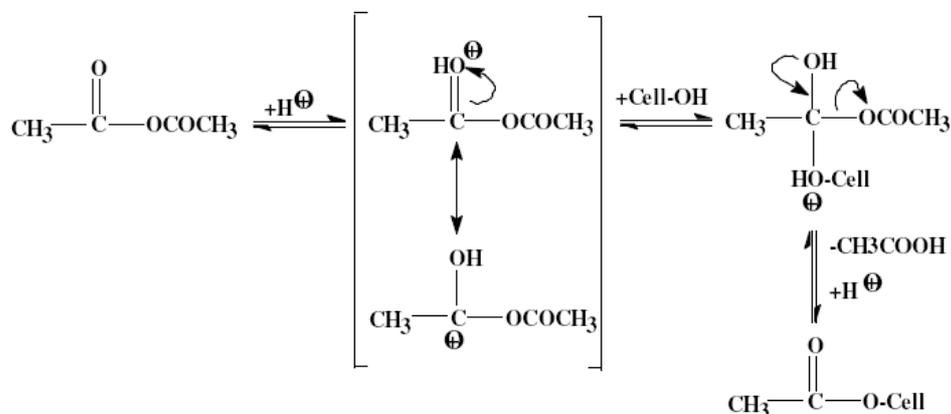
#### 1.5.1.1 Acetato de celulose

A primeira preparação de acetato de celulose foi criada por Schützenberger em 1865 [57]. Os acetatos de celulose foram preparados pela reacção da celulose com anidrido acético, utilizando ácido acético como solvente e ácido sulfúrico como catalisador. Nesta reacção ocorre a substituição dos grupos hidroxilos. O termo triacetato é usado como uma descrição genérica das fibras, em que pelo menos 92% dos grupos hidroxilos são acetilados [59].

Actualmente existem duas técnicas de acetilação, a acetilação homogénea, onde a celulose acetilada é dissolvida num solvente à medida que se forma, e a acetilação heterogénea, na qual a estrutura da fibra é mantida [57].

A preparação dos acetatos por acetilação homogénea dá-se em três etapas: pré-tratamento da celulose, acetilação e hidrólise dos ésteres de ácido sulfúrico. Usualmente, o pré-tratamento é realizado com ácido acético glacial, e tem como objectivo aumentar a reactividade da celulose, acelerando a reacção de acetilação. A acetilação ocorre na presença de um agente de acetilação, normalmente o anidrido acético, e de um catalisador. O ácido sulfúrico foi sugerido por Francimont em 1879 como catalisador, e ainda é actualmente o catalisador mais utilizado na acetilação. A acetilação ocorre de acordo com o mecanismo representado na Figura 14, onde o carbocatião electrofílico, formado a partir da protonação do anidrido acético, é adicionado a um átomo de oxigénio de um grupo

hidroxilo da celulose. Este intermediário é então decomposto em acetato de celulose e ácido acético, com libertação de um protão [56].



**Figura 14:** Mecanismo de acetilação homogénea [56].

A reacção de acetilação é interrompida pela adição de água que destrói o excesso de anidrido, causando uma rápida hidrólise do ácido éster sulfato. A taxa de hidrólise é controlada pela temperatura, concentração do catalisador, e em menor extensão, pela quantidade de água. A taxa de hidrólise aumenta com o aumento da temperatura e da concentração do catalisador. Um elevado teor em água aumenta ligeiramente a hidrólise e ajuda a controlar a degradação [60].

Na acetilação heterogénea, camadas sucessivas das fibras de celulose reagem expondo novas superfícies para a reacção. A reacção é controlada pela difusão dos reagentes nas fibras de celulose, na qual vão promover o intumescimento ou a activação, antes da acetilação [60].

Na técnica heterogénea parte ou a totalidade do solvente ácido acético é substituído por um diluente, como o tolueno ou o hexano. A técnica heterogénea permite manter a estrutura fibrosa da celulose ao longo da reacção. Os agentes de activação são, normalmente, solução de ácido acético ou ácido acético glacial [60]. A Tabela 6 apresenta-nos algumas aplicações dos acetatos de celulose, bem como a sua solubilidade, consoante o seu grau de substituição.

**Tabela 6:** Solubilidade e aplicações dos acetatos de celulose consoante o grau de substituição [56, 57].

Grau de Substituição (DS)	Solubilidade	Aplicações
1,8 – 1,9	Água - propanol - clorofórmio	Compósitos
2,2 – 2,3	Acetona	Plásticos
2,3 – 2,4	Acetona	Filmes, fibras
2,5 – 2,6	Acetona	Filmes de segurança e raios-X
2,8 – 2,9	Solução de diclorometano e etanol	Isolantes
2,9 -3,0	Diclorometano	Tecidos

Os acetatos de celulose podem ser caracterizados quanto ao seu grau de substituição (DS). O grau de substituição determina as aplicações dos acetatos de celulose. O grau de substituição pode ser determinado por saponificação, onde se faz reagir o acetato de celulose com uma solução de hidróxido de sódio, na presença de um agente que provoque intumescimento. O grau de substituição é determinado pela contra-titulação do excesso de hidróxido de sódio com uma solução de ácido clorídrico. Outros métodos têm sido investigados na determinação do grau de substituição, como a espectroscopia de infravermelho e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear [60].

Actualmente, a maioria dos acetatos de celulose são produzidos a partir da pasta celulósica da madeira, devido ao seu favorável preço e à sua constante disponibilidade. Tanto pastas kraft como pastas sulfito podem ser usadas para a obtenção de acetatos desde que possuam alguns requisitos (Tabela 7) [56].

**Tabela 7:** Propriedades das pastas para a obtenção de acetatos de celulose [56, 60].

Propriedades	Valor
$\alpha$ -celulose	>95,6
Pentosanas (%)	<2,1
Viscosidade intrínseca (dm <sup>3</sup> /kg)	550-750
Extractáveis em éter (%)	<0,15
Cinzas (%)	<0,08
Ferro (mg/kg)	<10

No que diz respeito à biodegradabilidade, os acetatos de celulose com grau de substituição até 2,2 são biodegradáveis no solo e em ambientes marinhos, além da sua compostagem ser bastante satisfatória. Para graus de substituição mais elevados, entre 2,2 e 3,0, os acetatos de celulose são menos biodegradáveis, podendo mesmo não o serem [61].

### 1.5.2 Éteres de celulose

A maioria dos éteres comercialmente importantes são solúveis em água, como a metilcelulose, a carboximetilcelulose e a hidroximetilcelulose, ou solúveis em solventes orgânicos, como é o caso da etilcelulose [56]. Os éteres de celulose são empregues numa larga gama de indústrias, como: comidas, revestimentos, recuperação de óleo, cosméticas, produtos farmacêuticos, adesivos, cerâmica, tecidos, materiais de construção, e agricultura [62].

A produção de éteres de celulose ocorre pela reacção da celulose com reagentes alcalinos, sob condições heterogéneas, normalmente na presença de uma base como NaOH e de um diluente inerte [62]. Os éteres de celulose são solúveis em água e em solventes orgânicos dependendo da natureza do substituinte e do grau de substituição [59]. Existem vários processos para produzir éteres de celulose. De um modo geral, a celulose, derivada da madeira, algodão ou de resíduos agro-florestais, é convertida em celulose alcalina (equação 8) e reage com um reagente eterificante, como o cloreto de metilo (equação 9).

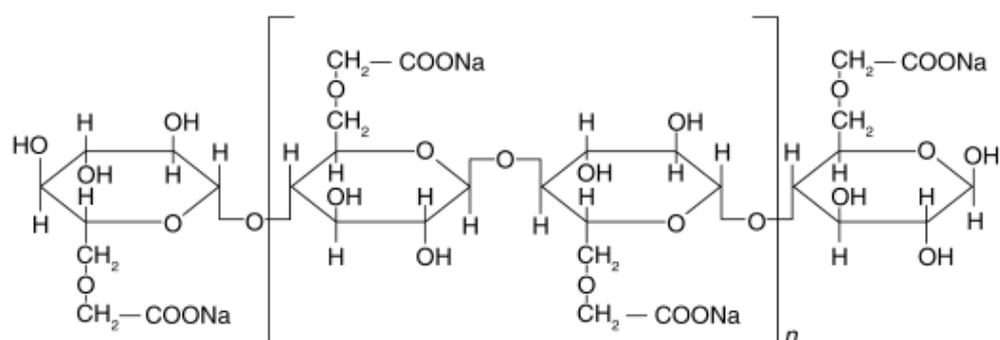


Onde R = radical de anidroglicose

Durante a preparação da celulose alcalina com NaOH concentrado, e subsequente eterificação, as regiões cristalinas são extensivamente degradadas devido à ruptura das ligações de hidrogénio inter-molecular [63].

### 1.5.2.1 Carboximetilcelulose

A preparação da CMC foi patenteada pela primeira vez em 1918. A carboximetilcelulose (CMC) (Figura 15) é o derivado de celulose solúvel em água mais conhecido [56]. A carboximetilcelulose é um derivado de celulose preparada através da celulose alcalina com ácido cloroacético [56]. A carboximetilcelulose é um importante produto industrial, geralmente isolado e comercializado como sal de sódio, e possui grupos carboxilatos que conferem solubilidade em água quando o grau médio de substituição é maior que 0,5 [64]. A CMC pode ser utilizada numa grande variedade de produtos como: detergentes, produtos farmacêuticos e cosméticos e cerâmica [65].



**Figura 15:** Estrutura da carboximetilcelulose [65].



## Capítulo II. Materiais e Métodos

---

Neste Capítulo são descritos os materiais, os procedimentos e as técnicas experimentais empregues na caracterização química do engaço de uva.

Os procedimentos experimentais envolvidos na caracterização e modificação química do engaço de uva são, na sua maioria, procedimentos experimentais utilizados nas análises de madeiras. Em alguns casos, foram introduzidas eventuais adaptações ao material em estudo. Para cada parâmetro foram realizadas, no mínimo, duas réplicas.

### 2. Matéria-prima utilizada

Neste estudo foram utilizados engaços de uva da variedade *Vitis vinífera*, recolhidos em Setembro de 2007 na Adega Cooperativa de Silgueiros, região do Dão – Portugal. O engaço de uva não participou no processo produtivo do vinho, uma vez que foi retirado por uma desengaçadeira.

O material recolhido foi seco à temperatura ambiente durante cerca de duas semanas e moído num moinho de martelos. O material final adquiriu uma granulometria de cerca de 2 mm de diâmetro.

#### 2.1 Análise química do engaço da uva e da matéria fibrosa isolada

##### 2.1.1 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade do engaço da uva foi determinado gravimetricamente. Este método baseia-se no registo da perda de massa da amostra ( $1\text{g} \pm 0,001\text{g}$ ), antes e após secagem, durante 3h numa estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ . O procedimento foi repetido até peso constante. O teor de humidade ( $W$ ) foi determinado pela equação 10.

$$W(\%) = \left( 1 - \frac{\text{massa da amostra seca}}{\text{massa da amostra húmida}} \right) \times 100 \quad (10)$$

### 2.1.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas (fracção inorgânica) foi determinado por calcinação de  $1\text{g} \pm 0,001\text{g}$  de engajo a  $525^\circ\text{C}$  durante duas horas, de acordo com a Norma Tappi T 211 om-93. A percentagem de cinzas ( $Z$ ) foi determinada pela equação 11.

$$Z(\%) = \frac{\text{massa de cinzas}}{\text{massa da amostra seca}} \times 100 \quad (11)$$

### 2.1.3 Determinação do teor de extractáveis

#### **Em acetona**

A determinação do teor de extractáveis foi efectuada segundo a Norma Tappi T 204 om-88. Foram utilizadas cerca de  $10\text{g} (\pm 0,0001)$  de matéria-prima e de pasta, num soxhlet de  $50\text{mL}$ , com  $200\text{mL}$  de acetona. A extracção ocorreu durante 4 horas. O solvente foi evaporado num evaporador rotativo e os extractos foram secos na estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  até peso constante. O teor de extractáveis foi determinado pela equação 12.

$$E(\%) = \frac{\text{massa de extractáveis}}{\text{massa da amostra seca}} \times 100 \quad (12)$$

#### **Em diclorometano**

Repetiu-se o procedimento anterior substituindo a acetona pelo diclorometano.

#### **Em água quente**

Para a determinação de extractáveis em água quente, o engajo livre de extractáveis em acetona foi tratado com uma solução de citrato de amónio ( $0,10\text{g/mL}$ ), procedendo-se ao refluxo desta mistura durante uma hora. O material extraído em água quente foi determinado gravimetricamente de acordo com a equação 13.

$$\text{Extractáveis em } H_2O (\%) = \frac{\text{massa de extractáveis}}{\text{massa de amostra seca}} \times Ke \times 100 \quad (13)$$

em que,

$$Ke = \frac{100 - E}{100}$$

#### 2.1.4 Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo tratamento de cerca de 5 gramas de engaço livre de extractáveis com uma solução de 1% de pepsina em 0,1 N HCl. A solução resultante foi colocada a 37°C durante 16 horas [66]. Filtrou-se a solução e o resíduo foi lavado com água quente até à neutralização e seco a 60°C até peso constante. As proteínas foram determinadas por diferença de peso, segundo a equação 14.

$$P (\%) = \frac{\text{massa de proteínas}}{\text{massa da amostra seca}} \times Ke \times 100 \quad (14)$$

em que,

$$Ke = \frac{100 - E}{100}$$

onde,

E – Teor de extractáveis em acetona

#### 2.1.5 Determinação de taninos

Para a determinação de taninos pesaram-se cerca de 4 g do engaço extraído em acetona e livre de proteínas, e foram adicionados 200 mL de uma solução de NaOH a 0,3%. A mistura foi mantida sob refluxo e atmosfera de azoto durante 1 hora. O material extraído foi filtrado e lavado com água quente até à neutralização. O resíduo resultante foi seco a 60°C até peso constante. O teor de taninos foi quantificado gravimetricamente de acordo com a equação 15.

$$T(\%) = \frac{\text{massa de taninos}}{\text{massa da amostra seca}} \times Ke \times Kp \times 100 \quad (15)$$

em que,

$$Ke = \frac{100 - E}{100} \quad Kp = \frac{100 - P}{100}$$

onde,

E – Teor de extractáveis em acetona

P – Teor de proteínas

### 2.1.6 Determinação do teor de lenhina Klason

O teor de lenhina no engaço foi determinado em amostras livres de extractáveis, proteínas e taninos, pelo método de Klason, descrito na norma Tappi T 222 om-88 que quantifica a lenhina como resíduo sólido. O método de Klason é um método de determinação directa e, como tal, tem como princípio, o isolamento e a determinação da lenhina insolúvel em ácido, sendo calculado pela equação 16.

$$L(\%) = \frac{\text{massa de lenhina}}{\text{massa da amostra seca}} \times Ke \times Kp \times Kt \times 100 \quad (16)$$

em que,

$$Ke = \frac{100 - E}{100} \quad Kp = \frac{100 - p}{100} \quad Kt = \frac{100 - t}{100}$$

onde,

E – Teor de extractáveis em acetona

P – Teor de proteínas

T – Teor de taninos

### 2.1.7 Determinação do teor de celulose (*Kürscher e Höffer*)

O teor de celulose foi calculado pela aplicação do método de *Kürscher e Höffner* que consiste no tratamento das amostras com ácido nítrico e etanol (1:4, v/v). Este método envolve o refluxo de cerca de 1g ( $\pm 0,0001$ g) de engaço em 50mL de uma solução de ácido nítrico e etanol (1:4, v/v) durante 3 horas. No final de cada hora, o sobrenadante foi retirado por decantação e adicionou-se mais 50 mL da solução de ácido nítrico e etanol (1:4, v/v). O resíduo insolúvel obtido no final das 3 horas é filtrado num cadinho de vidro G2 e lavado com água quente. O teor de celulose das amostras de engaço foi determinado a partir da equação 17.

$$\text{Celulose (\%)} = \frac{\text{massa de celulose}}{\text{massa da amostra seca}} \times 100 \quad (17)$$

### 2.1.8 Determinação do teor de hemiceluloses

O teor de hemiceluloses foi calculado pela aplicação da equação 18.

$$\text{Hemicelulose (\%)} = \text{MassaTotal} - (\text{Celulose} + L + Z + E + P + T) \quad (18)$$

onde, *L* representa o teor de lenhina, *Z* o teor de cinzas, *E* o teor de extractáveis, *P* o teor de proteínas e *T* o teor de taninos.

### 2.1.9 Determinação de açúcares

A determinação dos açúcares neutros consiste na hidrólise ácida dos polissacarídeos. Os polissacarídeos foram hidrolisados por tratamento de cerca de 10 mg de engaço e de pasta com 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%. Após incubação, num digestor, durante 3 horas à temperatura ambiente (25 °C), foram adicionados 4,4 mL de água destilada e, posteriormente, foi a incubar a 100 °C, durante mais 2h30 min.

O passo seguinte consistiu na redução dos açúcares: o hidrolisado foi arrefecido e adicionou-se 200  $\mu$ L de 2-desoxiglucose como padrão interno. A cerca de 1 mL deste

hidrolisado adicionou-se, em gelo, 0,2 mL de  $\text{NH}_3$  a 25 % e, em seguida, para reduzir os monossacarídeos a alditóis, adicionaram-se 0,1 mL de  $\text{NH}_3$  3M contendo 150 mg/mL de  $\text{NaBH}_4$ . Incubou-se a 30°C durante 1 hora.

Após a redução dos açúcares, procedeu-se à eliminação do  $\text{NaBH}_4$  pela adição de 50 $\mu\text{L}$  (duas adições) de ácido acético glacial, e arrefeceu-se em gelo.

Para a acetilação dos alditóis, adicionou-se 0,45 mL de 1-metilimidazola e 3 mL de anidrido acético a 0,3 mL de solução e incubou-se a mistura a 30 °C durante 30 minutos.

Para a destruição do anidrido acético e extracção dos acetatos de alditol das amostras foi adicionado 4,5 mL de água destilada e 3 mL de diclorometano. Por 3 vezes a solução foi agitada e centrifugada (2000 rpm, 30 segundos), procedendo-se à aspiração da camada superior (aquosa) e adição de 3 mL de água destilada e 2 mL de diclorometano. Procedeu-se à evaporação do diclorometano sob atmosfera de azoto.

Seguidamente, adicionou-se 1 mL de acetona à solução e procedeu-se à evaporação da mesma em atmosfera de azoto. Repetiu-se mais uma vez a adição e evaporação da acetona até evaporação completa.

A quantificação dos acetatos de alditol foi feita num cromatógrafo de gás Varian 3350 com a injeção de 0,2  $\mu\text{L}$  de amostra. Para a quantificação utilizaram-se rectas de calibração previamente elaboradas. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injecto 220°C; temperatura inicial da coluna 220°C (5 min); gradiente de temperatura 10°C/min; temperatura final da coluna 230°C (6 min); temperatura do detector 230°C.

#### **2.1.10 Determinação dos conteúdos catiónicos (Ca, K, Mg, Na e Zn)**

Para a determinação dos conteúdos catiónicos pesou-se cerca de 1g ( $\pm 0,0001$  g) das cinzas obtidas e adicionou-se uma solução de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  (1:3) até que as amostras se encontrassem completamente cobertas pela solução. Evaporou-se até obter-se cerca de 1 mL. Acrescentou-se 20 mL de  $\text{HCl}$  a 5% e aqueceu-se a solução. Aferiu-se a solução obtida para 100 mL com água desionizada. Os catiões foram determinados por espectrofotometria de absorção atómica.

### **2.1.11 Isolamento da lenhina por acidólise**

A lenhina foi isolada por acidólise segundo o método descrito na literatura [67]. Primeiramente, procedeu-se a uma extracção com acetona, com cerca de 5 g de engaço, durante 3 horas (ver procedimento da secção 2.1.3). Após a extracção, tratou-se o resíduo com pepsina durante 24 horas a 40°C (ver procedimento da secção 2.1.4). Por fim, efectuou-se a acidólise do engaço por refluxo do material, em solução com cerca de 500 mL dioxano/água, 9:1 (v/v) e 7 mL HCl (0,1M) concentrado, em atmosfera de azoto. Foram realizadas três extracções, com 60 minutos cada uma, com solução renovada após cada extracção. Após as extracções, o resíduo foi filtrado e os extractos foram concentrados no evaporador rotativo. Por fim, adicionou-se água destilada ao extracto de modo a precipitar a lenhina, sob intensa agitação. A lenhina foi centrifugada e exaustivamente lavada com água destilada até pH neutro. A lenhina foi seca num excicador de vácuo sob NaOH.

### **2.1.12 Oxidação com nitrobenzeno**

A lenhina é susceptível a uma larga variedade de oxidantes, entre os quais o nitrobenzeno, que é responsável pela degradação da lenhina em aldeídos aromáticos e ácidos carboxílicos [68].

A determinação de cada aldeído na mistura oxidativa conduz à caracterização química da lenhina, sendo este método, por isso, uma importante ferramenta para a caracterização estrutural da lenhina [68].

A oxidação com nitrobenzeno foi realizada segundo o método descrito na literatura [68]. A cerca de 60 mg de engaço livre de extractáveis adicionou-se 5 mL de NaOH 2M e 0,5 mL de nitrobenzeno, num microdigestor de capacidade 50 mL. Colocou-se o microdigestor na estufa a 180°C, durante 2 horas e 15 minutos. Após arrefecimento filtrou-se o material e lavou-se o material com 5 mL com uma solução de NaOH 0,2 M. A fase aquosa foi acidificada a pH 2 com HCl concentrado. A solução acidificada foi transferida para uma ampola de decantação e extraída 3 vezes com 30 mL de éter etílico. Em cada uma das extracções a fase orgânica foi recolhida, seca com NaSO<sub>4</sub> anidro e evaporada até à secura.

Os produtos de oxidação foram dissolvidos em 200 µL de piridina e analisados por GC/MS. A amostra foi analisada por GC/MS num cromatógrafo Trace Gas Chromatograph 2000 Séries equipado com um espectrómetro de massa Thermo Scientific DSQII, usando hélio como gás de arraste (35 cm/s) e coluna capilar DB-1 J&W (30 m × 0,32 mm *i.d.* 0,25 µm). As condições de análises foram as seguintes: temperatura do injector – 240°, temperatura inicial da coluna – 80°C, temperatura final da coluna – 270°C, gradiente de temperatura – 4°C/min e temperatura do detector – 250°C.

### **2.1.13 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

As amostras de engaço, de lenhina *Klason*, de lenhina-dioxano, e do material fibroso isolado (pasta) foram preparadas em KBr numa proporção de 2:200, e foram prensadas num pastilhador a 8 toneladas durante cerca de 3 minutos. Os espectros de FTIR das amostras foram adquiridos num espectrofotómetro Mattson 7000 FTIR, com uma resolução de 4,0 cm<sup>-1</sup> e 64 scans, registados na região do infravermelho médio, que se estende no intervalo 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

### **2.1.14 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear**

As análises de amostras em estado sólido de engaço, de lenhina *Klason*, da pasta e da pasta acetilada, foram efectuadas num espectrómetro de RMN BRUKER AVANCE 400, com um campo magnético estático de 9,4 T. As amostras foram colocadas num rotor de zircónia seladas com tampas de Kel-FTM e colocadas em rotação a 7 kHz. Os parâmetros de aquisição usados foram os seguintes: pulso de protões de 4 µs, tempo de contacto de 2 ms, atraso de 4 s e 7000 scans.

Para a obtenção do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da lenhina-dioxano foi necessário acetilar a lenhina. Para a acetilação da lenhina pesaram-se cerca de 30 mg de lenhina-dioxano e adicionaram-se 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético. Colocou-se a mistura na estufa a 50°C durante 18 horas. Seguidamente, adicionaram-se 5 mL de diclorometano, e após 30 minutos adicionaram-se 5 mL de HCl 8%, aspirando-se a fase aquosa. A lavagem com HCl e posterior aspiração da fase aquosa foi realizada mais duas vezes. Procedeu-se à

lavagem com água destilada e aspirou-se a fase aquosa. Por fim, adicionou-se sulfato de sódio anidro e evaporou-se a fase orgânica até à secura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da lenhina acetilada foi registado, num espectrómetro de RMN FT BRUKER AMX 300, à temperatura ambiente. A lenhina acetilada foi dissolvida em clorofórmio- $d_1$  (numa concentração de aproximadamente 5%) contendo tetrametilsilano como referência interna. O número de pulsos de  $90^\circ$  aplicados foi de 200 a 250 com duração de 12  $\mu\text{s}$  e um intervalo entre pulsos de 2s.

O espectro 2D RMN  $^1\text{H}$  (espectro COSY em modo absoluto) da lenhina-dioxano foi registado adquirindo incrementos 2K x 512 transformados em numa matriz de dados 2K x 1K. O espectro COSY foi adquirido numa janela de 9 ppm em ambas as direcções F1 e F2. Foram acumulados 600 scans para cada valor de  $t_1$ . A lenhina foi acetilada em  $\text{CDCl}_3$  a  $25^\circ\text{C}$  em tubos de 5 mm.

### 2.1.15 Cromatografia de permeação em gel - GPC

O peso molecular médio da lenhina isolada no ponto 2.1.11 foi determinado através da cromatografia de permeação em gel – GPC. A análise por GPC foi realizada num aparelho PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories Ltd., U.K.) equipado com uma pré-coluna Plgel 10  $\mu\text{m}$  e uma coluna Plgel 10  $\mu\text{m}$  MIXED D 300 x 7,5 mm e detector de índice de refacção. O sistema de injeção e as colunas foram mantidos a  $70^\circ\text{C}$ . As soluções de lenhina (4%) foram preparadas imediatamente antes da análise por dissolução em DMF contendo 0,5% LiCl. O fluxo de eluente (0,5% LiCl em DMF) foi de 0,9 mL/min. A calibração foi realizada utilizando amostras de lenhina cujo peso molecular médio foi previamente determinado por ESI-MS

### 2.1.16 Difraccção de Raios-X

Para avaliar a cristalinidade da celulose isolada pelo método de *Kürscher e Höffer* (ver secção 2.1.7) recorreu-se à difracção de raios-X. Para esta análise prepararam-se pastilhas da celulose isolada, que foram analisadas por difracção de raios-X num difractómetro Philips X'Pert MPD, usando uma fonte de  $\text{Cu-K}_\alpha$  ( $\lambda=0,154$  nm) numa gama de  $2\theta$  entre  $2-40^\circ$  e um varrimento de  $0,02^\circ/\text{scan}$ . Os difractogramas foram estudados para obtenção dos dados necessários ao cálculo dos parâmetros do cristalito. O grau de

cristalinidade foi determinado comparando a magnitude relativa da difracção total das fases cristalina e amorfa. A equação 19 representa o cálculo do grau de cristalinidade ( $I_{Co}$ ), e a equação 20 representa o cálculo do grau de cristalinidade corrigido para 100% de polissacarídeos ( $I_C$ ) [69].

$$I_{Co} = \frac{I_{cr'} + I_{cr}}{I_{total}} \times 100 \quad (19)$$

onde,

$I_{Co}$  é o grau de cristalinidade;

$I_{total}$  é a soma de  $I_{am}$ ,  $I_{Cr'}$  e  $I_{Cr}$ , identificadas no difractograma da Figura 16;

$I_{cr}$  e  $I_{am}$  correspondem às intensidades das regiões de celulose cristalina e amorfa.

A equação 20 representa o cálculo do grau de cristalinidade corrigido para 100% de polissacarídeos.

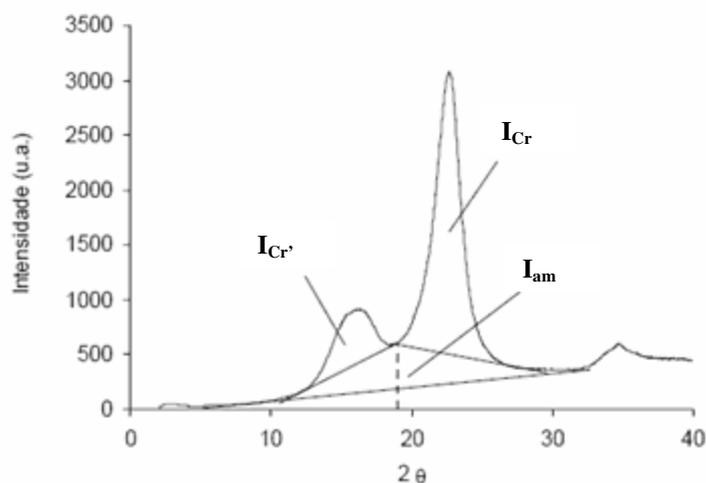
$$I_C = I_{Co} \times [1 + K(w^{-1} - 1)] \quad (20)$$

onde,

$I_C$  é o grau de cristalinidade corrigido para 100% de polissacarídeos;

$K$  é uma constante (= 0,3);

$w$  é igual a 0,95 para a celulose isolada.



**Figura 16:** Identificação das áreas cristalinas e amorfas no difractograma da celulose.

Relativamente ao cálculo dos parâmetros do cristalito, a largura média de cristalito no plano de rede 002,  $d_{002}$ , foi determinada a partir da equação de *Scherer* (21)[69]:

$$d_{002} = \left[ \left( \frac{\beta_{002} \cdot \cos \theta_{002}}{\lambda} \right)^2 - \left( \frac{\delta_L}{d_L} \right)^2 \right]^{-1/2} \quad (21)$$

onde,

$\beta_{002}$  é ao valor (em radianos) da largura a meia altura da reflexão do plano 002;

$\theta_{002}$  é o máximo da reflexão do plano 002 (em radianos);

$\lambda$  é o comprimento de onda usado pela fonte de raios-X (0,154 nm);

$\delta_L$  é um parâmetro relacionado com a distorção da rede perpendicular à direcção do plano 002 (0,05nm)

$d_L$  representa um parâmetro relacionado com a distância entre os planos de rede 002 (0,395 nm).

A altura média do cristalito ( $b$ ) é determinada analisando o reflexo do plano 040 e aplicando a Lei de *Bragg* (22):

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta_{040} \quad (22)$$

onde,

$n$  representa a ordem do feixe difractado;

$d$  o espaçamento entre os planos de difracção

$\theta_{040}$  é o ângulo correspondente ao reflexo do plano 040.

Como numa célula unitária de celulose nativa podem-se identificar quatro secções originadas pelo plano 040, a altura média de cristalito é dada por a equação 23:

$$b = 4 \times d \quad (23)$$

## **2.1.17 Análises térmicas**

### **2.1.17.1 Análise termogravimétrica (TGA)**

Efectuaram-se análises termogravimétricas (TGA) a cerca de 10-12 mg de pasta acetilada durante 5 e 15 minutos. Estas análises foram realizadas no equipamento TGA-50, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, com uma velocidade de aquecimento de 2°C/min, numa gama de 25 a 600°C.

### **2.1.17.2 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)**

Foram aquecidas cerca de 10-12 mg de pasta acetilada durante 5 e 15 minutos até 500°C e depois foram arrefecidas de 500°C a 25°C. A análise DSC foi realizada num equipamento DSC-50, sob atmosfera N<sub>2</sub>, com uma velocidade de aquecimento de 2°C/min, numa gama de 25 a 500°C.

## **2.2 Obtenção de matéria fibrosa (Pastas)**

Para a obtenção de matéria fibrosa (pasta) realizaram-se dois tipos de cozimento: o cozimento kraft e o cozimento oxidativo com ácido peracético, descritos nos itens seguintes.

### **2.2.1 Cozimento kraft**

A cerca de 3 gramas de engaço adicionou-se 12 mL de uma solução constituída por NaOH e Na<sub>2</sub>S. O cozimento foi realizado em microdigestores de 50 mL de capacidade. A Tabela 8 apresenta-nos as condições utilizadas no cozimento kraft.

**Tabela 8:** Condições operacionais utilizadas nos ensaios de cozimento kraft do engaço da uva.

<b>Condições</b>	
Índice de Sulfureto (IS) %	28
Alcali activo %	18
Tempo total de cozimento (min)	120
Temperatura (°C)	165

### **2.2.2 Cozimento oxidativo com ácido peracético (Pa)**

A obtenção de pasta celulósica a partir do engaço da uva foi realizada num reactor com controlo de temperatura e equipado com um agitador mecânico. Para cada ensaio utilizaram-se 5 gramas de engaço. A Tabela 9 descreve as condições em que ocorreu o tratamento.

**Tabela 9:** Condições utilizadas nos ensaios de cozimento pelo processo organosolv.

	<b>1º Estágio</b>	<b>2º Estágio</b>
Concentração de ácido peracético - Pa (%)	7,5	7,5
Tempo (min)	20	10
Temperatura (°C)	85	85
pH	4	4

Após o tratamento com ácido peracético, as pastas resultantes foram filtradas e lavadas com água destilada até pH neutro. Por fim, as pastas foram colocadas a secar à temperatura ambiente e foram armazenadas, para posteriores análises e aplicações.

### **2.3 Análise das pastas**

Na análise das pastas determinou-se a viscosidade intrínseca e o teor de lenhina residual.

### 2.3.1 Determinação da viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca foi determinada segundo a Norma SCAN-CM 15:88. Este método avalia a degradação da celulose da pasta durante o seu cozimento ou branqueamento.

A cerca de 150 mg de pasta adicionou-se 25 mL de água destilada e colocou-se o frasco a agitar com 3 fios de cobre, a 600 rpm durante 45 minutos. De seguida, adicionou-se 25 mL de solução aquosa de cuprietenodiamina 1M (CED), para dissolução dos polissacarídeos. Completou-se o volume do frasco com uma solução de CED e água destilada 1:1 até perfazer o volume do frasco; arrolhou-se o frasco sem deixar bolhas de ar e levou-se a agitar a 600 rpm durante 45 minutos. Anotou-se rigorosamente o volume da solução de CED e água destilada adicionados à razão de 1:1.

Por fim, foi medido o tempo de escoamento da solução de CED com a pasta no viscosímetro capilar a uma temperatura controlada de 25° C, e calculou-se a viscosidade relativa segundo a equação 24:

$$\eta_{rel} = h \times t_e \quad (24)$$

onde,

$\eta_{rel}$ : viscosidade relativa

h: constante do viscosímetro ( $s^{-1}$ )

$t_e$ : tempo de eluição da amostra (s)

Pela análise da Tabela 1 da Norma SCAN-CM 15:88, determinou-se viscosidade intrínseca ( $\eta$ ), em mL/g, a partir da relação  $\eta_{rel} \rightarrow \eta \times C$ ; onde C é a concentração da solução de amostra em g/mL.

### 2.3.2 Determinação do teor de lenhina residual

O teor de lenhina residual, nas pastas obtidas por tratamento organosolv, foi determinado por espectroscopia de ultravioleta segundo a literatura [70]. A concentração de lenhina foi determinada, pela Lei de Beer, aplicando o valor da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) determinada no item seguinte.

Efectuaram-se as leituras das absorvâncias num espectrofotómetro *scanning* entre 205 e 500 nm a 200nm/min. O teor de lenhina residual foi determinado pela equação 25:

$$\text{Lenh \%} = \frac{C_{\text{lenh}} \times 30}{G \times 10} \times 100 \quad (25)$$

onde,

$C_{\text{lenh}}$  – concentração de lenhina (g/L)

G – massa da pasta (g)

### 2.3.2.1 Determinação da absorvidade molar ( $\epsilon$ )

A absorvidade molar foi determinada por espectroscopia de ultravioleta segundo a literatura [70]. Pesou-se 11,7 mg de lenhina-dioxano obtida em 2.1.11 e diluiu-se em 15 mL de cadoxeno. Efectuou-se a linha de base a 280 nm, com o branco preparado com cadoxeno de água destilada 1:1. Registou-se a absorvância da solução a 280 nm, e calculou-se a absorvidade molar da lenhina a partir da equação 26:

$$A = \epsilon \times C \times l \quad (26)$$

onde,

A – Absorvância a 280 nm

$\epsilon$  – Absorvidade Molar ( $\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

C – Concentração da lenhina (g/L)

l - comprimento da célula (cm)

## 2.4 Modificação das pastas por acetilação parcial

Para a síntese do acetato de celulose, por acetilação parcial, adicionaram-se 5 mL de ácido acético glacial a cerca de 1g de pasta, agitando-se periodicamente durante 1 hora, à 80°C. O ácido acético glacial permite inchar as fibras de celulose e aumentar a sua reactividade.

De seguida, adicionou-se uma mistura de 20 mL de tolueno com 7 mL de anidrido acético e 2 a 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Filtrou-se a solução ao fim de 2, 5, 15, 30 e 60 minutos. O precipitado obtido foi lavado com um pouco de tolueno, hidrogenocarbonato de sódio a 1% e água quente. As pastas acetiladas foram secas a 60°C até peso constante.

#### 2.4.1 Determinação do grau de substituição

As pastas acetiladas obtidas em 2.4 foram caracterizadas quanto ao grau de substituição (DS). A cerca de 0,4 g de pasta acetilada adicionaram-se 25 mL de uma solução de etanol 75% (v/v). A mistura foi submetida a refluxo a 60 °C durante 30 minutos. O condensador foi equipado com um tubo com grânulos de NaOH para consumir o CO<sub>2</sub> atmosférico. De seguida, adicionaram-se mais 25 mL de NaOH 0,5M e levou-se a mistura a refluxo a 60°C por mais uma hora. Depois de arrefecimento à temperatura ambiente durante duas horas, o excesso de NaOH foi titulado com HCl 0,5M aferido. O rendimento do acetato de celulose foi obtido pela equação 27.

$$CH_3COO^- (\%) = \frac{(V_1 - V_2) \times F \times 0,0295 \times 100}{m} \quad (27)$$

onde,

V<sub>1</sub> é o volume de HCl para o ensaio em branco;

V<sub>2</sub> é o volume de HCl para o ensaio com a pasta acetilada;

F é o coeficiente de correcção da solução de HCl 0,5 M aferido;

0,0295 g é a quantidade de grupos acetilos, em gramas, que corresponde a 1 mL de HCl 0,5 M;

m é a massa da pasta acetilada (g).

O grau de substituição foi calculado através da equação 28.

$$DS = \frac{CH_3COO^- (\%)}{100} \times \frac{MM(pasta\ acetilada)}{MM(CH_3COO^-)} \quad (28)$$

## Capítulo III. Resultados e Discussão

Neste Capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos da caracterização química do engaço, das pastas e das pastas acetiladas, assim como da caracterização estrutural da lenhina.

### 3. Caracterização química do engaço da uva

Com vista a um melhor entendimento do engaço da uva, e à avaliação do seu potencial como fonte de novos materiais, nomeadamente para a obtenção de pasta celulósica, foi necessário proceder-se a uma caracterização química detalhada do material em estudo.

As análises químicas foram realizadas sobre o material resultante da moagem (fracção de 2 mm). A Tabela 10 compila os resultados da caracterização química do engaço da uva.

**Tabela 10:** Composição química do engaço da uva.

Composição	Percentagem (%)
<b>Humidade</b>	20,7
<b>Cinzas</b>	7,0
<b>Extractáveis</b>	
Acetona	2,3
Diclorometano	1,0
Água quente	23,7
<b>Celulose Kürschner - Höffer</b>	30,3
<b>Proteínas <sup>a</sup></b>	6,1
<b>Taninos <sup>b</sup></b>	15,9
<b>Lenhina Klason <sup>c</sup></b>	17,4
<b>Hemiceluloses</b>	21,0

<sup>a</sup> corrigido para o teor de extractáveis

<sup>b</sup> corrigido para o teor de extractáveis e proteínas

<sup>c</sup> corrigido para o teor de extractáveis, proteínas e taninos

O teor de cinzas foi determinado a partir do engaço não extraído observando-se que o teor de cinzas (material inorgânico) está de acordo com os dados na literatura, rondando os 7% [2, 7]. Este valor é superior comparativamente com a madeira de resinosas e de folhosas (0,2-1,0 %) [71].

O teor de cinzas depende não só da espécie em causa, como também da parte da planta em análise. As cinzas são essencialmente constituídas por óxidos, hidróxidos e carbonatos de cálcio, potássio e magnésio [72, 73]. A Tabela 11 apresenta-nos os catiões determinados a partir das cinzas do engaço.

**Tabela 11:** Composição dos componentes catiónicos das cinzas obtidas do engaço.

Componentes Catiónicos	(g/Kg de cinzas)
Cálcio (Ca)	19,0
Potássio (K)	124,4
Magnésio (Mg)	1,9
Sódio (Na)	0,03
Zinco (Zn)	0,10

Pela análise da tabela, verificou-se que o potássio, o cálcio e o magnésio são os catiões mais abundantes nas cinzas do engaço da uva. A presença maioritária destes três catiões, está de acordo com o obtido por outros autores [26], sendo de destacar a elevada presença de potássio, relativamente aos outros elementos minerais existentes no engaço da uva.

Os extractáveis são compostos de baixo peso molecular com diferentes polaridades. Deste modo, foram realizadas extracções com acetona, diclorometano, e água quente. Na madeira, os compostos extraídos em água são principalmente, sais minerais inorgânicos, açúcares, proteínas, polissacarídeos e algumas substâncias fenólicas. Os compostos solúveis em solventes orgânicos pertencem às classes dos ácidos gordos e ésteres, álcoois de cadeia longa, e compostos fenólicos [74, 75]. A determinação do teor de extractáveis, em diclorometano e acetona, vai de encontro com o teor de extractáveis das madeiras de folhosas (1-5%) e de resinosas (3-8 %) [49]. Por sua vez, o teor de extractáveis em água quente mostrou-se muito superior (23,7 %) em relação aos extractáveis em água quente de algumas folhosas (5,71%). Este valor tão elevado pode ser explicado pela remoção de substâncias pécicas e de taninos, uma vez que os taninos podem ser extraídos em água quente [74].

O teor de proteínas foi determinado pelo tratamento de uma amostra de engaço livre de extractáveis com uma solução de pepsina a 1%. O teor de proteínas rondou os 6%, um valor semelhante ao teor de proteínas de outras plantas anuais, como é o caso do kenaf [66].

Os taninos estão presentes nas plantas vasculares em diferentes abundâncias, dependendo da espécie. Os taninos juntamente com as hemiceluloses, celulose e lenhina constituem os componentes primários dos tecidos lenhosos. Em alguns tecidos, como folhas e casca, os taninos podem ser mais abundantes do que a lenhina [76]. O valor encontrado para o teor de taninos no engaço foi de 15,9%. Este valor engloba os taninos condensados e os taninos hidrossolúveis.

Relativamente à determinação da celulose (30,3%), esta encontra-se dentro da gama descrita na literatura (24-38%) para o engaço da uva [2, 7, 20]. Para a determinação da lenhina *Klason*, procedeu-se a uma extracção do material com acetona, seguindo-se a remoção de proteínas e de taninos, uma vez que, as proteínas e os taninos poderiam avultar os resultados. O valor obtido para a lenhina *Klason* foi de 17,4%, sendo inferior aos valores mencionados na literatura [7, 20]. Alguns elevados valores do teor de lenhina encontrados na literatura (>30%) podem ser explicados pela presença de proteínas e taninos nas amostras, uma vez que as proteínas podem condensar com a lenhina, aquando do tratamento com ácido sulfúrico, induzindo em erro a determinação da lenhina [66].

As hemiceluloses foram quantificadas segundo a equação 18 (secção 2.1.8). O valor encontrado foi de 21%, sendo este valor superior aos valores encontrados na literatura para o engaço da uva (14-15%) [7, 20].

Para uma caracterização mais alargada da fracção polissacarídica do engaço da uva, realizou-se a análise aos açúcares na matéria-prima original. A Tabela 12 apresenta-nos a composição média em monossacarídeos no engaço.

Pela análise da Tabela 12 verificou-se que os açúcares maioritários são a glucose (62,7%), a xilose (20,4%), seguindo-se a arabinose (5,5%) e a galactose (4,9%). Os 62,7% de glucose provêm essencialmente da celulose, mas também de algumas hemiceluloses. O segundo monossacarídeo mais predominante no engaço é a xilose, com 20,4 %, sugerindo-nos a presença de xilanas. Tendo em conta o teor dos polissacarídeos no engaço da uva (51,3%) (Tabela 10), o teor relativo de xilose (Tabela 12) e contributo médio de ácidos urónicos nas xilanas (à volta de 10%), o teor de xilanas espectável ronda os 12%.

**Tabela 12:** Composição média em monossacarídeos no engaço.

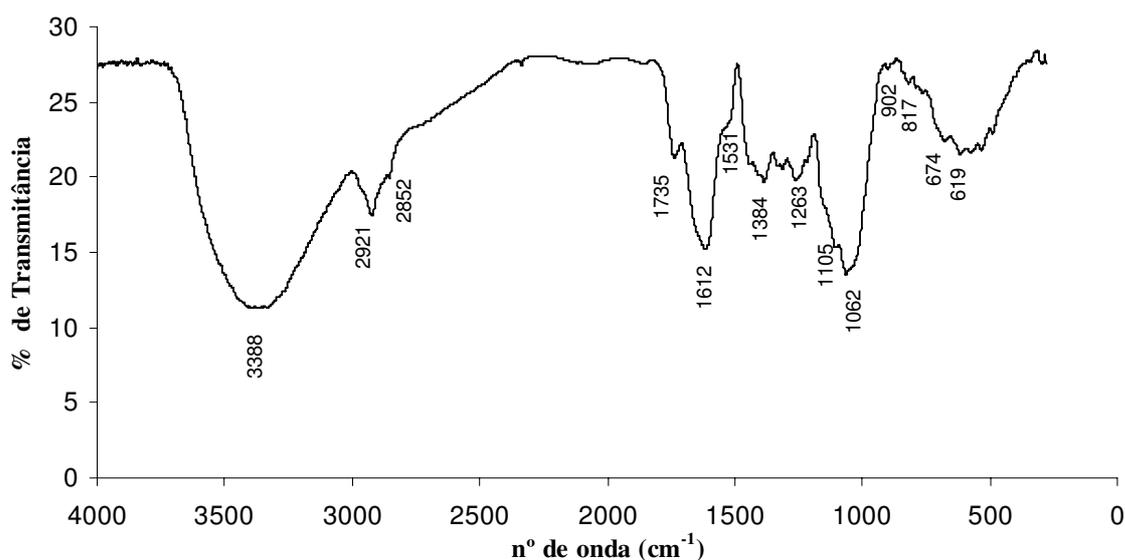
Monossacarídeos	% ( $m_{\text{mon}}/ m_{\text{t mon}}$ )
Ramnose	1,7
Fucose	<0,2
Arabinose	5,5
Xilose	20,4
Manose	4,8
Galactose	4,9
Glucose	62,7

\*  $m_{\text{mon}}$  – massa de monossacarídeos

$m_{\text{t mon}}$  – massa total de monossacarídeos

### 3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de infravermelho tem sido muito utilizada para a caracterização química de materiais lenhocelulósicos [77]. Na Figura 17 apresenta-se o espectro de FTIR do engaço da uva. A Tabela 13 sumaria as principais bandas detectadas e respectivas atribuições a cada banda.



**Figura 17:** Espectro de FTIR do engaço da uva.

O espectro de FTIR obtido para o engaço da uva revelou a presença de vários sinais entre 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . A banda a 3409  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos hidroxilos (vibrações de alongamento) provenientes de álcoois, fenóis, ácidos carboxílicos. As bandas 2921  $\text{cm}^{-1}$  e 2852  $\text{cm}^{-1}$  sugerem a presença de compostos alifáticos (vibrações de alongamento simétricas e assimétricas). A presença de polissacarídeos, nomeadamente hemiceluloses, é confirmada pela banda a 1735  $\text{cm}^{-1}$ , que é atribuída a elongação C=O em ésteres [77, 78]. A banda a cerca de 1612  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à elongação das ligações C=C e pode ser atribuída a compostos aromáticos, possivelmente lenhina ou taninos. As bandas 1263  $\text{cm}^{-1}$  e 1062  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a componentes de lenhina, sendo que a banda 1263  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada com as unidades guaiacilo da lenhina [17-19].

**Tabela 13:** Atribuições das bandas no infravermelho do engaço da uva [17-19, 37, 52, 78-80].

$\text{cm}^{-1}$	Atribuição
3409	$\nu$ OH de álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos
2921	$\nu_a$ CH em $\text{CH}_3$ e $\text{CH}_2$ alifáticos
2852	$\nu_s$ CH em $\text{CH}_2$ alifáticos
1735	$\nu$ C=O em ésteres
1612	$\nu$ C=C (aromático) atribuído a compostos aromáticos
1531	$\nu$ C=C (aromático)
1384	$\delta_s$ C-H atribuído à celulose e hemiceluloses
1370	$\delta$ C-H em $\text{CH}_3$ de grupos $\text{OCH}_3$
1270-1275	$\nu$ C-O (aromático) de $\text{C-OCH}_3$
1263	$\nu$ C-O atribuído à presença de lenhina (unidades guaiacilo)
1062	$\delta$ C-O confirmação da presença de lenhina, polissacarídeos
902	$\delta$ C-H na celulose; presença de ligações glicosídicas na celulose e hemiceluloses
619	$\omega$ C-H (aromático) em lenhinas

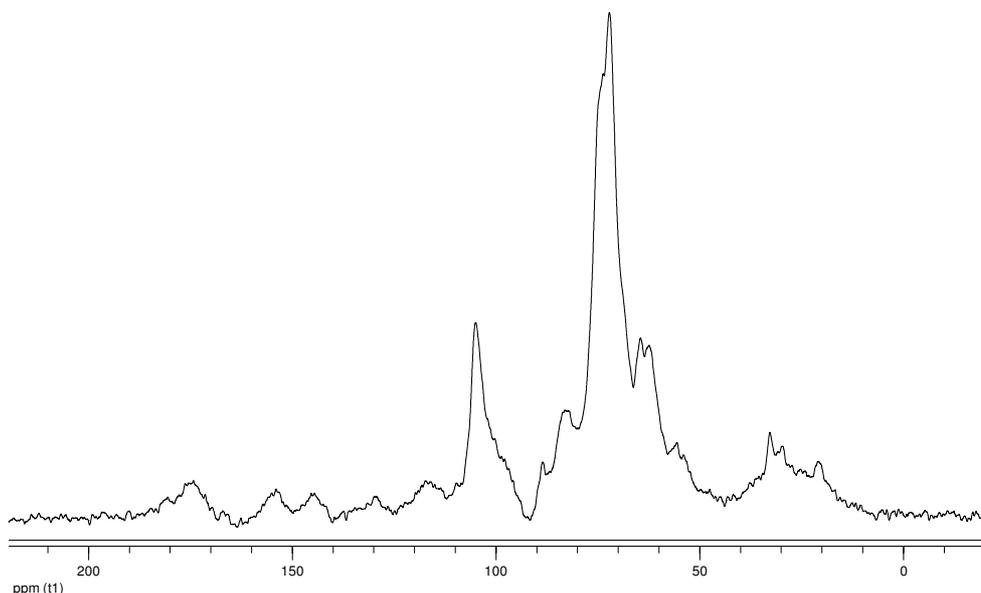
( $\nu$ ) - elongação; ( $\nu_s$ ) - elongação simétrica; ( $\nu_a$ ) - elongação assimétrica;

( $\delta$ ) - deformação angular; ( $\delta_s$ ) - deformação angular simétrica; ( $\delta_a$ ) - deformação angular assimétrica;

( $\omega$ ) - deformação angular fora do plano.

### 3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS

Analogamente à espectroscopia de infravermelho, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica muito utilizada na caracterização química de materiais lenhocelulósicos. A Figura 18 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtido a partir do engaço de uva e na Tabela 14 encontram-se as atribuições dos sinais detectados. Estas atribuições foram feitas perante estudos existentes na literatura [17, 79, 81].



**Figura 18:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS do engaço da uva.

Pela análise do espectro verificamos que os picos correspondentes à celulose encontram-se na região entre 60 e 105 ppm. Os sinais entre 62-64 ppm correspondem ao C-6 da celulose e hexosanas e ao C-5 da xilanas, enquanto que as ressonâncias entre 70-80 ppm são atribuídas aos C-2,3,5 da celulose, hexosanas e aos C-2,3,4 das xilanas. O C-4 da celulose pode ser observado entre 84 e 90 ppm, e o C-1 da celulose e da xilanas é observado entre 101-104 ppm [17, 79, 81].

Os picos a cerca de 174 ppm e 21 ppm estão relacionados com as ressonâncias de grupos acetilos das hemiceluloses [17].

Os grupos metóxilos ( $\text{OCH}_3$ ) das unidades estruturais da lenhina originam um sinal a cerca de 56 ppm. A região entre 100 e 125 ppm é característica dos carbonos terciários. Por sua vez, os carbonos quaternários não oxigenados da lenhina originam sinais entre

126-136 ppm, enquanto que os carbonos oxigenados da lenhina provocam sinais entre 136 e 156 ppm [17, 79].

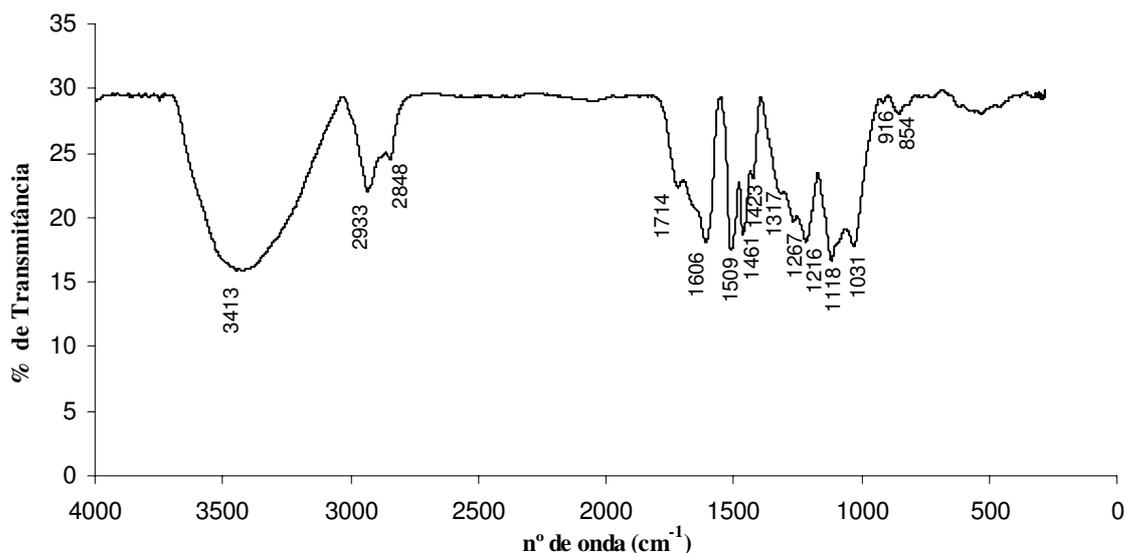
**Tabela 14:** Atribuições dos desvios químicos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido do engaço da uva [17, 79, 81].

$\delta$ (ppm)	Atribuição
21	-CH <sub>3</sub> COOH de hemiceluloses
20-50	Grupos CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> em cadeias alifáticas
56	Grupos metóxilos (OCH <sub>3</sub> ) em lenhina
62-64	C-6 da celulose, hexosanas, C-5 da xilanas
70-80	C-2,3,5 da celulose, hexosanas, C-2,3,4 da xilanas
84-90	C-4 da celulose e hexosanas
101-104	C-1 da celulose, hexosanas e xilanas
100-125	Carbonos terciários da lenhina e taninos
126-136	Carbonos quaternários não oxigenados da lenhina e taninos
136-156	Carbonos quaternários oxigenados da lenhina e taninos
172-175	-COOH e COOR de grupos acetilos de hemiceluloses

### 3.3 Lenhina Klason

#### 3.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica não destrutiva que fornece informação primária acerca da estrutura da lenhina. Esta técnica quando aplicada à lenhina permite identificar as diferentes unidades da lenhina, assim como também permite a estimativa de grupos metóxilos [77]. A Figura 19 apresenta o espectro obtido para a lenhina Klason e a Tabela 15 indica as principais bandas e as respectivas atribuições.



**Figura 19:** Espectro de FTIR da lenhina Klason.

O espectro representado é um espectro típico de lenhina, onde se pode observar bandas relativas a vibrações do anel aromático. A banda a  $1461\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a uma deformação assimétrica C-H no anel aromático, a banda a  $1423\text{ cm}^{-1}$  corresponde a uma deformação C-H em  $\text{OCH}_3$ , e as bandas a  $1509\text{ cm}^{-1}$  e  $1606\text{ cm}^{-1}$  correspondem a deformações C=C (aromático) e C=O (aromático), respectivamente [82].

As bandas  $1267\text{ cm}^{-1}$ ,  $916\text{ cm}^{-1}$  e  $854\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas às unidades G da lenhina. A  $1714\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma elongação C=O de cetonas não-conjugadas na estrutura da lenhina [37, 77, 83].

Através da análise do espectro da lenhina Klason ainda não podemos induzir acerca do tipo de lenhina. No entanto, este espectro fornece-nos algumas indicações a esse respeito, uma vez que visualizamos bandas características da lenhina tipo G mais intensas ( $1267$ ,  $916$  e  $854\text{ cm}^{-1}$ ). Outra indicação, que nos faz pensar que se trata de lenhina tipo G é o facto de não observarmos as bandas a  $1328$ - $1330\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem a elongação C-O em unidades seringilo, e as bandas  $1128$ - $1125\text{ cm}^{-1}$  que correspondem à deformação C-H (aromático) típica de unidades seringilo [37, 77, 82].

**Tabela 15:** Atribuições das bandas de FTIR da lenhina Klason [37, 52, 71, 77, 78, 80, 82, 84].

$\text{cm}^{-1}$	Atribuição
3413	$\nu$ OH de álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos
2933	$\nu_{\text{a}}$ CH em $\text{CH}_3$ e $\text{CH}_2$ em cadeias alifáticas
2848	$\nu_{\text{s}}$ CH em $\text{CH}_3$ $\text{CH}_2$ em cadeias alifáticas
1714	$\nu$ C=O não conjugado em cetonas
1606	$\nu$ C=O (aromático)
1509	$\nu$ C=C (aromático)
1461	$\delta_{\text{a}}$ C-H no anel aromático
1423	$\delta$ C-H em $\text{OCH}_3$ e do esqueleto aromático
1317	$\text{C}_{\text{aril}}-\text{OCH}_3$
1267	$\nu$ C-O (atribuído às unidades G da lenhina)
1118	$\delta$ C-H (aromático)
1031	$\delta$ C-O em grupos álcoois
916	$\omega$ C-H (aromático) (atribuído às unidades G)
854	$\omega$ C-H (aromático) (atribuído às unidades G)

( $\nu$ ) - elongação; ( $\nu_{\text{s}}$ ) - elongação simétrica; ( $\nu_{\text{a}}$ ) - elongação assimétrica;

( $\delta$ ) - deformação angular; ( $\delta_{\text{s}}$ ) - deformação angular simétrica; ( $\delta_{\text{a}}$ ) - deformação angular assimétrica; ( $\omega$ ) - deformação angular fora do plano.

### 3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS

O RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS permite a análise estrutural da lenhina, sendo que, actualmente, é uma importante ferramenta analítica para elucidar a estrutura da lenhina. A Figura 20 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da lenhina Klason, livre de extractáveis, proteínas e taninos, e a Tabela 16 indica os principais sinais detectados e respectivas atribuições.

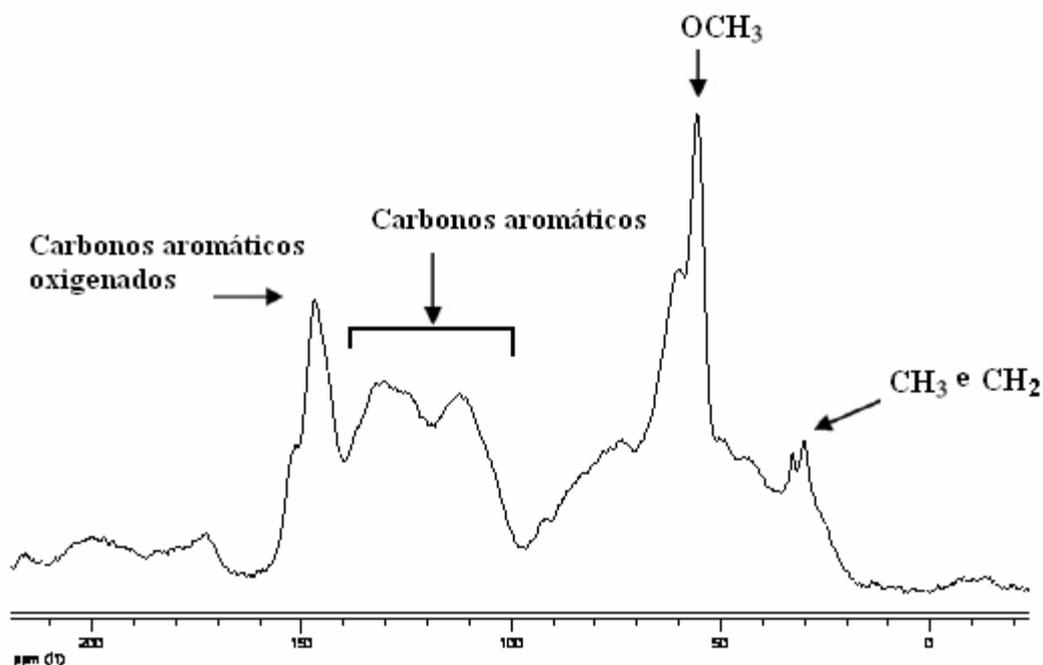


Figura 20: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da lenhina Klason.

Pela análise do espectro, verificou-se que se trata de um espectro típico de lenhinas. A elevada intensidade do sinal a 56 ppm é indicativo da abundância dos grupos metóxilos ( $\text{OCH}_3$ ) na lenhina. Os carbonos terciários aromáticos (C-C) originam sinal entre 102 e 125 ppm, enquanto que os carbonos aromáticos oxigenados (C-O) geram sinal entre 135-155 ppm. Entre 105-110 ppm observamos sinais pouco intensos atribuídos às unidades S. No entanto, são observados sinais intensos entre 110-125 ppm correspondentes aos carbonos terciários nas unidades guaiacilo. Estas observações corroboram as observações efectuadas por FTIR (secção 3.3.1), ou seja, estamos perante lenhina tipo G, uma vez, que são observados sinais intensos entre 110-125 ppm (característicos de unidades G) e sinais pouco intensos entre 105-110 ppm (característicos de unidades S).

A presença de grupos alifáticos a cerca de 25-35 ppm dá-nos a indicação de que a amostra de lenhina poderia estar associada a extractáveis.

**Tabela 16:** Atribuições dos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido da lenhina Klason [37, 38, 79, 85, 86].

$\delta$ (ppm)	Atribuição
25-35	$\text{CH}_3$ e $\text{CH}_2$ em cadeias alifáticas
50-55	$\text{C}\beta$ em unidades $\beta$ - $\beta$ e $\beta$ -5
56	$\text{OCH}_3$
60	$\text{C}\gamma$ em $\beta$ -O-4
72	$\text{C}\gamma$ em $\beta$ - $\beta$
73	$\text{C}\alpha$ em unidades $\beta$ -O-4
84-89	$\text{C}\beta$ em unidades $\beta$ -O-4; $\text{C}\alpha$ em unidades $\beta$ -5 e $\beta$ - $\beta$
102-110	C-2,6 em unidades S
110-125	C-2,5,6 em unidades em G
126-134	C-1 unidades G e S eterificadas
134-140	C-4 em unidades S não eterificadas
142-146	C-4 em unidades G não eterificadas
146-149	C-3,4 em G eterificadas e C-3,5 em S não eterificadas
150-156	C-3,5 em unidades S não eterificadas

### 3.4 Isolamento e caracterização estrutural da celulose

#### 3.4.1 Difraccção de Raios -X

A celulose do engaço foi isolada pelo método *Kürschner-Höffer*. Este método caracteriza-se pelo isolamento directo da lenhina, uma vez que a etanólise ácida promove a eliminação da lenhina e taninos, assim como parte essencial das hemiceluloses.

A celulose isolada foi caracterizada por difracção de raios-X com o objectivo de obter informação sobre a estrutura cristalina do material em estudo (grau de cristalinidade, largura média e altura média do cristalito). A Figura 21 apresenta o difractograma obtido para a celulose isolada, onde podemos visualizar os domínios cristalinos ( $I_c$ ) e os domínios amorfos ( $I_{am}$ ).

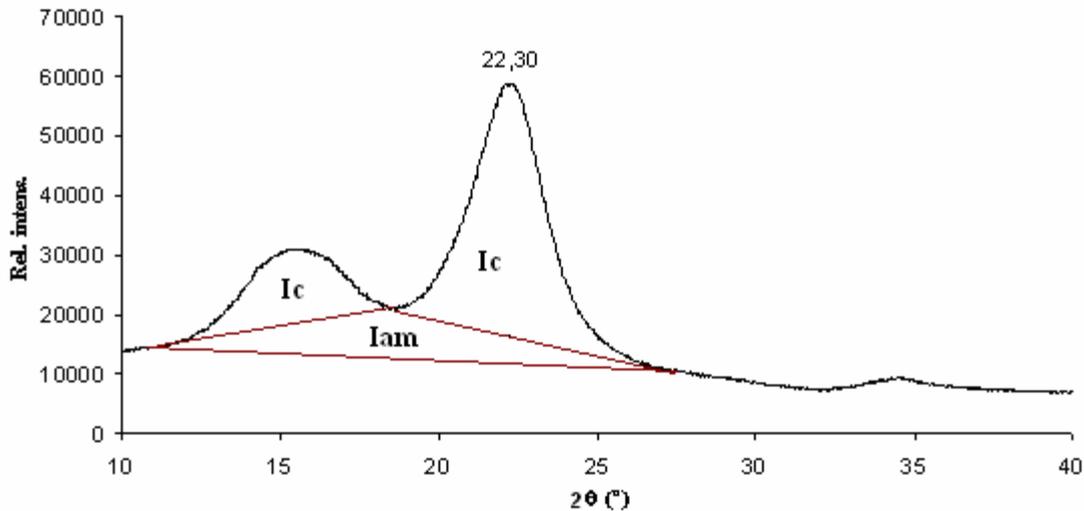


Figura 21: Diffractograma da celulose isolada.

O diffractograma obtido é muito semelhante a outros diffractogramas obtidos para a celulose I. O grau de cristalinidade ( $I_c$ ), as dimensões da célula unitária ( $a$ ,  $b$  e  $c$ ), a largura média do cristalito ( $d_{002}$ ) e o ângulo  $\gamma$  estão apresentados na Tabela 17. O grau de cristalinidade foi obtido aplicando a equação 20 (secção 2.1.16) e o valor encontrado foi de cerca de 75%. O grau de cristalinidade da celulose nas madeiras varia entre 63 e 68% [31, 33]. O maior grau de cristalinidade encontrado para a celulose isolada a partir do engaço da uva deve-se à menor fracção de celulose amorfa presente neste.

Relativamente às dimensões da célula unitária e ângulo  $\gamma$  verifica-se que estão de acordo com as dimensões obtidas para outras madeiras [31, 33].

Tabela 17: Grau de cristalinidade e dimensões do cristalito.

Índice de cristalinidade (%)		75,38		
Dimensões da célula unitária				
$a$ (nm)	$b$ (nm)	$c$ (nm)	$d_{002}$ (nm)	$\gamma$ (°)
8,0	1,03	7,9	4,201	91

## 4. Caracterização estrutural da lenhina

### 4.1 Caracterização estrutural da lenhina *in situ*

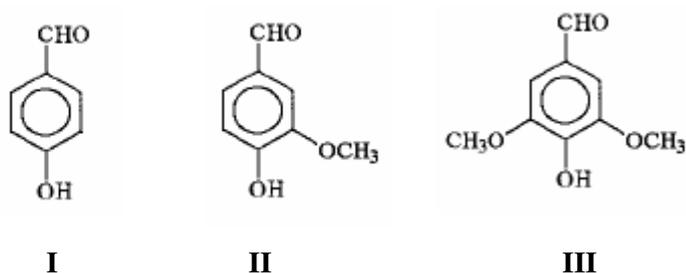
A caracterização estrutural da lenhina *in situ*, isto é, da lenhina no material de partida (engajo da uva) foi realizada por oxidação com nitrobenzeno. A oxidação com nitrobenzeno de lenhinas em meio alcalino foi introduzida em 1939 por Freudenberg e seus colaboradores [87].

#### 4.1.1 Oxidação com nitrobenzeno

A oxidação com nitrobenzeno é um método degradativo e é utilizado para a determinação de monómeros da lenhina em materiais lenhocelulósicos [37]. As unidades estruturais da lenhina H produzem *p*-hidroxibenzaldeído, as unidades estruturais da lenhina tipo G originam a vanilina e o ácido vanílico, enquanto que as unidades estruturais da lenhina tipo S produzem o seringaldeído e o ácido serínico [37]. Da oxidação com nitrobenzeno resulta, em quantidades consideráveis, a vanilina, o seringaldeído, o ácido vanílico e o ácido serínico [87].

A oxidação com nitrobenzeno também permite estimar a razão das diferentes unidades estruturais da lenhina (H, G e S) [67].

A Figura 22 apresenta-nos os produtos de degradação da lenhina, por oxidação com nitrobenzeno da lenhina do engajo, e identificados por GC/MS:



**Figura 22:** Produtos identificados por oxidação com nitrobenzeno. **I-** *p*-hidroxibenzaldeído; **II-** Vanilina; **III-** Seringaldeído.

Na Tabela 18 encontram-se apresentados os dados obtidos por GC/MS, como o tempo de retenção dos compostos obtidos por oxidação nitrobenzeno, a respectiva massa

molecular e a razão de unidades H:G:S calculada através da altura dos picos no cromatograma.

**Tabela 18:** Compostos identificados por GC/MS, tempo de retenção, massa molecular e razão H:G:S.

Produto	Tempo de retenção (min)	Fragmentação (m/z)	Origem	Abundância Relativa
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	4,93	52 (M <sup>+</sup> , 100); 122 (5); 93 (32); 77 (21); 65 (12); 39 (35)	H	3
Vanilina	10,60	152 (M <sup>+</sup> , 100); 123 (20); 109 (26); 81 (52); 63 (20); 39 (26)	G	71
Seringaldéido	18,12	182 (M <sup>+</sup> , 100); 153 (10); 139 (18) 111 (42); 96 (32); 77 (45); 39 (76)	S	26

A razão H:G:S foi determinada através da vanilina, seringaldéido e *p*-hidroxibenzaldeído. Pelo cromatograma pode-se verificar que a vanilina encontrava-se presente em elevadas quantidades, seguindo-se o seringaldéido e em quantidades quase vestigiais o *p*-hidroxibenzaldeído.

A razão H:G:S foi de 3:71:26, o que nos permite concluir que estamos perante lenhina tipo GS, com presença muito significativa de unidades G.

## 4.2 Isolamento e caracterização da lenhina-dioxano

### 4.2.1 Isolamento da lenhina por acidólise

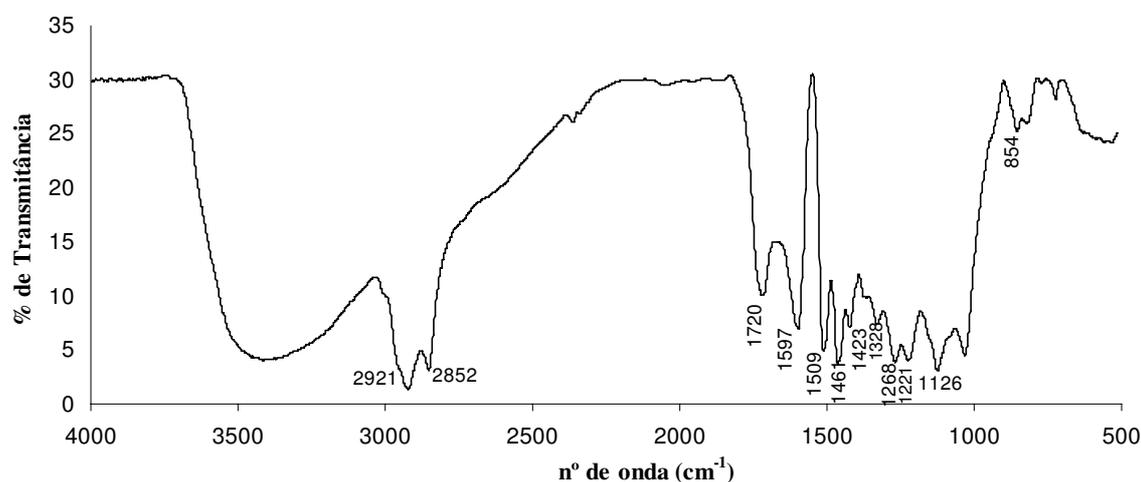
O isolamento da lenhina-dioxano, a partir de materiais lenhocelulósicos foi desenvolvido por Pepper e seus colaboradores em 1959. O isolamento da lenhina por acidólise utiliza uma solução de dioxano-água (9:1 v/v) em condições ácidas [88]. A acidólise provoca a clivagem parcial de ligações  $\beta$ -O-4 e todas ligações de  $\alpha$ -O-4. Esta clivagem leva a alguma despolimerização da lenhina [89]. Neste trabalho foi utilizada técnica de acidólise suave envolvendo tratamentos de curta duração utilizando uma solução de dioxano-água (9:1 v/v) com HCl 0,1M [67]. Esta técnica permitiu isolar a lenhina pouco alterada.

## 4.2.2 Caracterização estrutural da lenhina-dioxano

A lenhina-dioxano foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de próton (RMN de  $^1\text{H}$  e RMN a duas dimensões – COSY) e por cromatografia de permeação de gel (GPC).

### 4.2.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

O espectro da lenhina-dioxano está apresentado na Figura 23. Este espectro é muito semelhante ao espectro obtido para a lenhina Klason, sendo que neste espectro as bandas encontram-se com uma melhor definição.

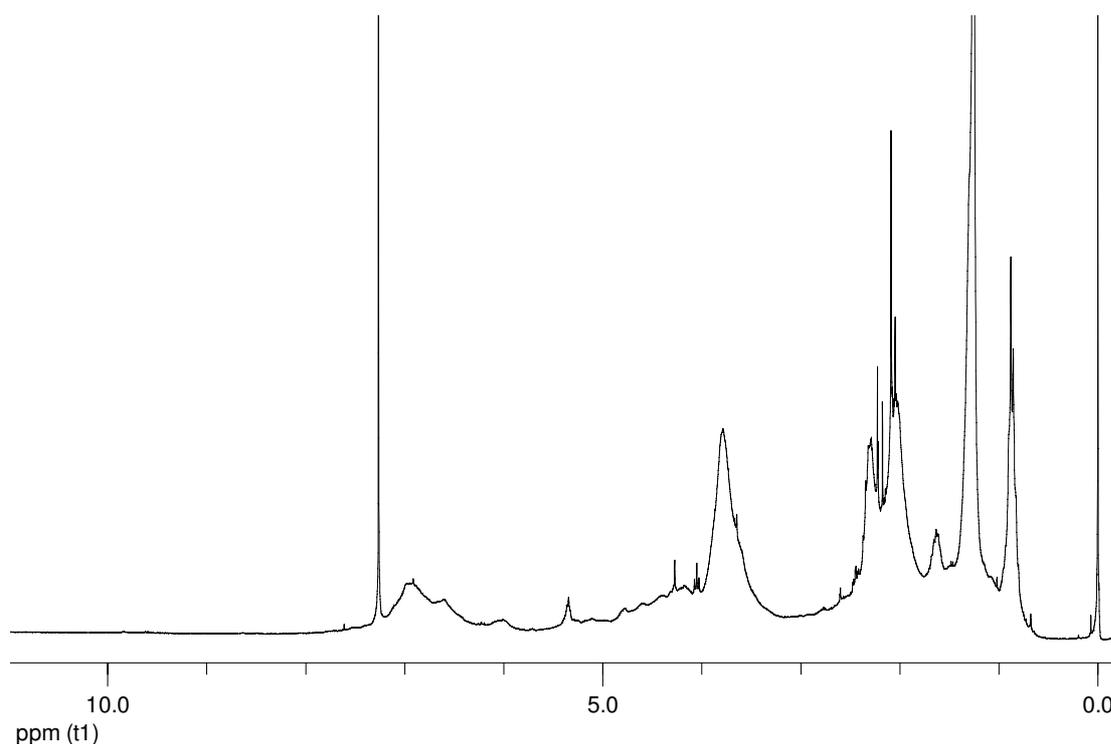


**Figura 23:** Espectro de FTIR da lenhina-dioxano.

A presença de bandas a 1423, 1268, e 1126  $\text{cm}^{-1}$ , e os resultados obtidos por RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da lenhina Klason, permitiu concluir a existência de elevadas unidades guaiacilo, uma vez que a banda a 1268  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à elongação C-O, atribuído às unidades G da lenhina, e a banda 1126  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à deformação C-H em  $\text{OCH}_3$  e do esqueleto aromático. A banda a 854  $\text{cm}^{-1}$  também confirma a existência de unidades guaiacilo [37, 78, 82]. Outro aspecto que corrobora estas afirmações é o facto de a banda a 1423  $\text{cm}^{-1}$  (relativa à presença de grupos metóxilos) ser uma banda muito fraca.

#### 4.2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton - RMN de $^1\text{H}$

A espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  é uma técnica utilizada para a caracterização e classificação de lenhinas, e para a determinação da estrutura da lenhina. As lenhinas são analisadas como derivados de acetato utilizando clorofórmio- $d_1$  como solvente [90]. A Figura 24 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da lenhina acetilada. A discussão dos resultados será feita com base na tabela de atribuições dos principais sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da lenhina acetilada (Tabela 19).



**Figura 24:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da lenhina acetilada.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da lenhina acetilada, os sinais detectados entre 0,7 e 1,5 ppm são atribuídos à ressonância dos prótons  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  das cadeias alifáticas na lenhina. Os prótons dos grupos metóxilos ( $\text{OCH}_3$ ) originam um forte sinal a 3,81 ppm. Os sinais na região entre 4,0 e 4,7 ppm são originados pelos prótons  $\text{H}_\beta$  e  $\text{H}_\gamma$  nas estruturas  $\beta\text{-O-4}$  e  $\beta\text{-5}$ . Os prótons aromáticos originam sinal entre 6,6 e 7,0 ppm, sendo que os prótons aromáticos das unidades G provocam sinal a cerca de 6,9 ppm, enquanto que os prótons aromáticos das unidades S ocasionam um sinal a 6,6 ppm. [37]. Estes resultados indicam que as ligações éter (ligações  $\beta\text{-O-4}$  e  $\beta\text{-5}$ ) são as ligações mais abundantes na estrutura da lenhina.

**Tabela 19:** Atribuições dos principais sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da lenhina acetilada [37, 67, 90].

$\delta$ (ppm)	Atribuição
0,7-1,5	Protões $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$ em cadeias alifáticas
1,8-2,2	Protões OH alifáticos
2,2-2,5	Protões OH fenólico
3,0-3,15	$\text{H}_\beta$ em estruturas $\beta$ - $\beta$
3,81	Protões em $\text{OCH}_3$
4-4,7	$\text{H}_\beta$ e $\text{H}_\gamma$ em estruturas $\beta$ -O-4 e $\beta$ -5
5,9-6,1	$\text{H}_\alpha$ em estruturas $\beta$ -O-4 e $\beta$ -1
6,6-7,0	Protões aromáticos

### Quantificação de Grupos Metóxilos

Através da oxidação com nitrobenzeno, e após razão H:G:S determinada, foi possível inferir acerca da quantidade de grupos metóxilos ( $(\text{OCH}_3)_n$ ) por unidade  $\text{C}_9$ . Assim, pela equação 29 conclui-se que por unidade  $\text{C}_9$  da lenhina obteve-se 1,23 grupos metóxilos:

$$\frac{\text{OCH}_3}{\text{C}_9} = 1,23 \text{ por UFP} \quad (29)$$

UFP- Unidade fenilpropano.

A técnica GC/MS aliada ao RMN de  $^1\text{H}$  permitiu determinar a quantidade de estruturas na lenhina acetilada, através da equação 30:

$$n_{\text{estrutura}} = \frac{I_{\text{protão característico na estrutura}}}{n_1 \times N} \quad (30)$$

onde,

$n_1 = 7,4$  (integral correspondente a um protão)

$N$  é o número de protões característicos na estrutura.

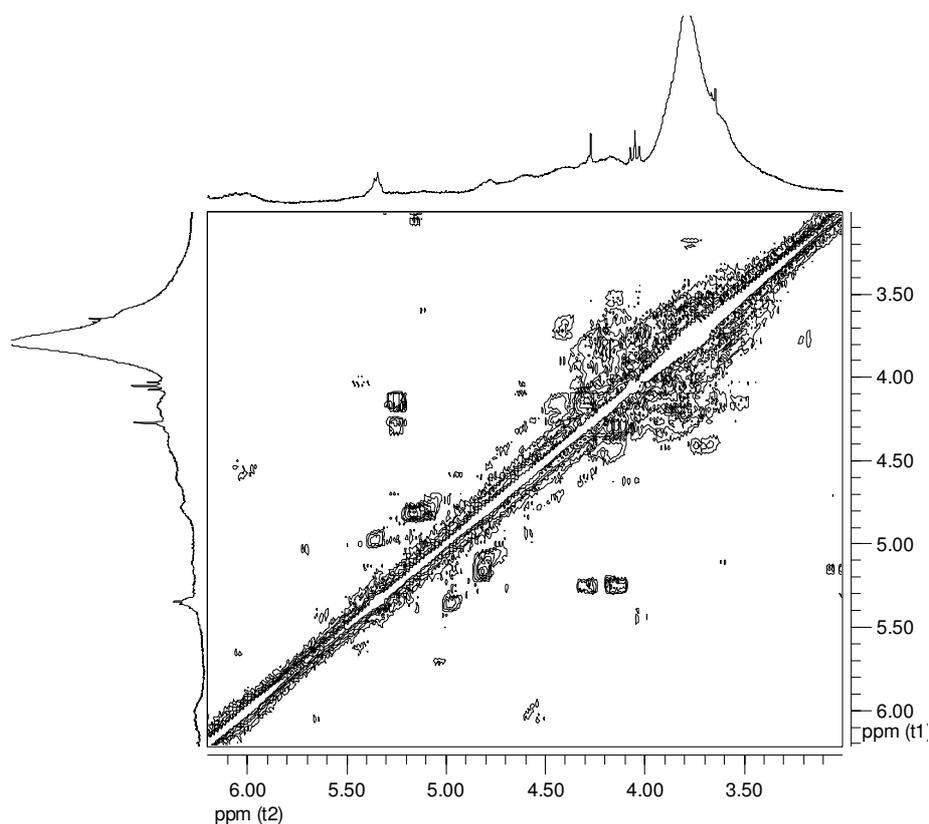
A equação expressa-nos o resultado em quantidade de protões /UFP

A aplicação da equação permite determinar alguns grupos funcionais característicos da lenhina, como os grupos metóxilos (OCH<sub>3</sub>), grupos OH<sub>fenólicos</sub> e OH<sub>alifáticos</sub>, assim como permite estimar a percentagem de estruturas β-O-4, e quantificar o número de protões aromáticos por unidade fenilpropano. Após a aplicação da equação obteve-se 3,7 protões OCH<sub>3</sub>/UFP. Relativamente à estrutura β-O-4 o valor encontrado foi de 0,27 protões/ UFP, ou seja, conclui-se que as ligações β-O-4 representam 27% do total das ligações na estrutura da lenhina. Quanto aos grupos OH<sub>fenólicos</sub> e OH<sub>alifáticos</sub> os valores encontrados foram de 0,82 protões/UFP e 1,50 protões/UFP, respectivamente. A quantidade de protões/UFP encontrada para os grupos OH<sub>fenólicos</sub> é muito superior aos valores encontrados para outras espécies de madeira, nomeadamente para o *E. globulus*, onde a quantidade de protões de grupos OH<sub>fenólicos</sub> ronda os 0,28 protões/UFP [33]. O número de protões aromáticos foi de 2,2 protões/UFP. Este valor obtido é inferior ao número de protões aromáticos determinados a partir dos produtos de oxidação com nitrobenzeno (2,75 protões/UFP). O número de protões aromáticos determinados a partir dos produtos de oxidação com nitrobenzeno e o número de protões aromáticos determinados a partir da equação 30 designam-se por valor teórico e valor real, respectivamente. Através do valor real e do valor teórico dos protões aromáticos determinou-se o grau de condensação da lenhina (equação 31) e conclui-se que se trata de uma lenhina bastante condensada, com 20% de unidades condensadas.

$$\text{Grau de condensação} = 1 - \frac{\text{Valor real}}{\text{Valor teórico}} \times 100 \quad (31)$$

#### 4.2.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear a duas dimensões (COSY)

A ressonância magnética nuclear a duas dimensões (COSY - *homonuclear correlation spectroscopy*) possibilita a detecção de acoplamentos entre protões, e assim seguir as correlações <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H de curta distância. A caracterização de lenhinas por RMN a duas dimensões oferece-nos uma maior informação acerca da estrutura da lenhina [91]. A Figura 25 apresenta-nos o espectro COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) da lenhina acetilada.



**Figura 25:** Espectro COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) da lenhina acetilada.

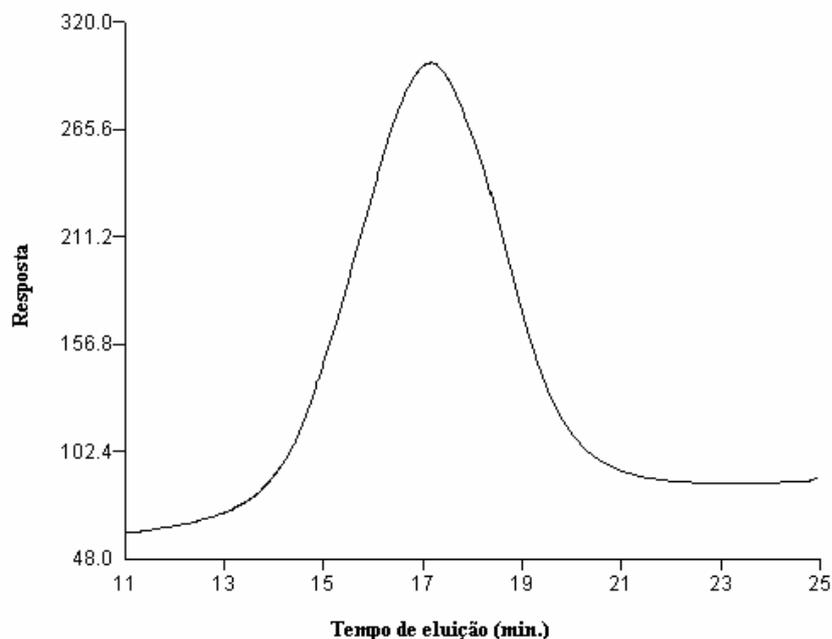
Com a utilização desta técnica foi possível confirmar os resultados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ . O espectro COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) obtido a partir da lenhina acetilada, permitiu confirmar a presença dominante das estruturas  $\beta$ -5 e  $\beta$ -O-4 na estrutura da lenhina. A estrutura  $\beta$ -O-4 foi confirmada pela observação do  $\text{C}_\alpha$  a 6,08 ppm e do  $\text{C}_\beta$  a 4,58 ppm. No entanto, na estrutura  $\beta$ -O-4 não foi possível observar o  $\text{C}_\gamma$ . Relativamente à estrutura  $\beta$ -5, foi possível observar as correlações do  $\text{C}_\alpha$  a 5,13 ppm, do  $\text{C}_\beta$  a 3,66 ppm e do  $\text{C}_\gamma$  a 4,18 ppm.

Uma vez que o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não nos permitiu quantificar a abundância das estruturas  $\beta$ -5, com a observação do espectro COSY foi possível verificar o teor significativo das estruturas  $\beta$ -5.

Pela análise deste espectro também observamos estruturas desconhecidas, em grande abundância, a 5,35 ppm e a 4,96 ppm. Em estudos futuros seria interessante investigar estas estruturas pela aplicação de outras técnicas que envolve uma correlação de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (tais como HSQC e HMBC).

#### 4.2.2.4 Cromatografia de permeação de gel – GPC

A cromatografia de permeação de gel (GPC) implica o fracionamento cromatográfico de macromoléculas, de acordo com o seu tamanho molecular, e por isso permite estimar o peso molecular da lenhina [33]. A Figura 26 apresenta-nos o perfil de eluição da lenhina-dioxano.



**Figura 26:** Cromatograma de permeação de gel da lenhina-dioxano.

Através da equação da recta de calibração (equação 32) determinou-se o peso molecular médio ( $M_w$ ) da lenhina-dioxano.

$$\log M_w = -0,3587 \times T + 9,6162 \quad (32)$$

onde, T é o pico de eluição principal (17,3 min).

Pela análise do cromatograma verifica-mos que o pico de eluição principal surge a 17,3 minutos. O peso molecular ( $M_w$ ) da lenhina foi calculado através da recta de calibração e o valor obtido foi de 2600 Da. Este valor, sendo superior, é relativamente semelhante aos pesos moleculares de lenhinas de eucalipto (2360-2160 Da)[33].

## 5. Obtenção de material fibroso

Para a obtenção do material fibroso (pasta), inicialmente utilizou-se o cozimento kraft, com índice de sulfureto a 28%, alcali activo a 18%, temperatura de cozimento a 165°C e tempo total de cozimento de 120 minutos. Este cozimento mostrou-se ineficaz na obtenção de pasta, uma vez que as amostras de engajo não eram deslenhificadas. Após o cozimento verificou-se que o teor de matéria insolúvel em ácido (72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) aumentou relativamente ao material inicial (17,4% no engajo e 33,3% na pasta kraft). Este facto pode ser explicado pela natureza complexa da lenhina em estudo, uma vez que se trata de uma lenhina altamente condensada e, possivelmente, estruturalmente associada com taninos. Provavelmente, a associação da lenhina com os taninos impediu que ocorresse a deslenhificação.

Dada a ineficácia do cozimento kraft, recorreu-se ao cozimento oxidativo com ácido peracético (Pa) em dois estágios (descrito na secção 2.2.2). Este cozimento já se mostrou bastante eficaz na deslenhificação do engajo. Na Tabela 20 apresentam-se alguns dos vários ensaios realizados para a obtenção de pasta, a diferentes concentrações de Pa e temperaturas.

**Tabela 20:** Ensaios realizados para a obtenção de pastas a diferentes concentrações de Pa, temperaturas, pH, e tempo de reacção.

Ensaio		Conc. Pa (%)	T (°C)	Tempo de reacção (min.)	pH	Rendimento (%)	Aspecto da pasta
Ensaio 1	1ºEstágio	17	80	45	2	33	1
Ensaio 2	1ºEstágio	15	90	45	2	30	2
Ensaio 3	1ºEstágio	12	85	20	3	27	3
	2ºEstágio	12	85	20	3		
Ensaio 4	1ºEstágio	7,5	85	20	4	38	3
	2ºEstágio	7,5	85	10	4		

1- pasta bastante amarela; 2- pasta menos amarela; 3-pasta branca

A realização de dois estágios permitiu racionalizar os reagentes utilizados e obter pastas mais branqueadas. Assim, o ácido peracético foi utilizado como agente deslenhificante e como agente branqueador. Foram realizados vários ensaios até se

concluir que a concentração de Pa a 7,5% nos dois estágios foi a que proporcionou um a pasta mais branqueada e um maior rendimento (35-38%). Inicialmente utilizou-se concentrações de Pa a 17% e observamos que a pasta apresentava uma coloração amarelada, apesar de prolongarmos o tempo de reacção. Para concentrações de Pa entre 12-15% verificou-se que as pastas resultantes estavam mais branqueadas mas o rendimento do processo baixava para os 27-30%.

O controle do pH de reacção é essencial para garantir a deslenhificação e o branqueamento, tentando evitar a degradação dos polissacarídeos. Segundo a literatura o pH que oferece maior eficiência na deslenhificação e branqueamento encontra-se entre 4 e 5 para Pa não destilados e 5 e 8 para Pa destilados [52]. Relativamente à temperatura observou-se que só a partir dos 80°C é que ocorria uma deslenhificação mais eficiente. No entanto, a utilização de temperaturas mais elevadas (>90°C), acarretavam a uma diminuição do rendimento (tal como observamos para a utilização de concentrações de Pa mais elevadas). A diminuição do rendimento, associada à temperatura, pode ser atribuída ao facto da temperatura intensificar a degradação dos polissacarídeos atribuída à hidrólise das ligações glicosídicas [52]. Alguns autores [52] sugerem que a temperaturas acima dos 90°C ocorre a decomposição ácido peracético, e sugerem também a utilização de Pa não destilado para a deslenhificação a temperaturas mais baixas, e a utilização de Pa destilado para temperaturas a acima dos 90°C. Este comportamento deve-se ao elevado teor de peróxido de hidrogénio residual na solução de Pa não destilado, que com o aumento da temperatura se decompõe e forma espécies radiculares menos selectivas [52].

Após vários ensaios a diferentes concentrações de Pa, a diferentes temperaturas e a diferentes tempos de reacção, observou-se que a concentração de Pa a 7,5% e uma temperatura de 85°C proporcionaram uma pasta branqueada e um maior rendimento.

As pastas celulósicas obtidas através do cozimento oxidativo com Pa, nas condições referidas em 2.2.2, foram caracterizadas quanto ao teor de açúcares, extractáveis, lenhina residual, viscosidade intrínseca, assim como pelas técnicas de FTIR e de RMN de <sup>13</sup>C CP/MAS.

## 5.1 Caracterização química da pasta

A caracterização química das pastas é muito importante para determinar as propriedades das pastas e futuras aplicações. Os resultados da análise química das pastas estão descritos na Tabela 21.

A percentagem de extractáveis em diclorometano nas pastas não excedeu os 0,33%, demonstrando que o tratamento com ácido peracético, além de remover a lenhina, remove parte dos extractáveis.

A determinação dos açúcares permitiu-nos verificar, que os açúcares maioritários são a glucose com 74,9% e a xilose com 22,3%. A arabinose inicialmente determinada no engaço não foi detectada na pasta, tendo-se verificado também um decréscimo do teor de galactose, manose e ramnose. Este facto pode ser explicado pela remoção de compostos pécnicos aquando do tratamento com ácido peracético. A partir da análise aos açúcares também pode-se concluir que as principais hemiceluloses do engaço são as xilanas. É de salientar que a presença de xilanas já tinha sido detectada por RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS do engaço (secção 3.2), onde o C-5 da xilanas foi detectado entre 62-64 ppm e o C-1 originou sinal entre 101-104 ppm. A remoção de compostos pécnicos permitiu isolar a celulose e as xilanas, daí que se obtiveram valores mais elevados de glucose e xilose relativamente ao engaço.

**Tabela 21:** Composição química das pastas.

Composição	Valor
<b>Extractáveis (%)</b> (diclorometano)	0,33
<b>Açúcares % (<math>m_{\text{mon}}/m_{\text{tmon}}</math>*)</b>	
Ramnose	0,4
Xilose	22,3
Manose	1,4
Galactose	1,0
Glucose	74,9
<b>Lenina residual (%)</b>	2-3
<b>Viscosidade intrínseca - <math>\eta</math> (<math>\text{cm}^3/\text{g}</math>)</b>	300-400

\*  $m_{\text{mon}}$  – massa de monossacarídeos

$m_{\text{tmon}}$  – massa total de monossacarídeos

### Viscosidade Intrínseca

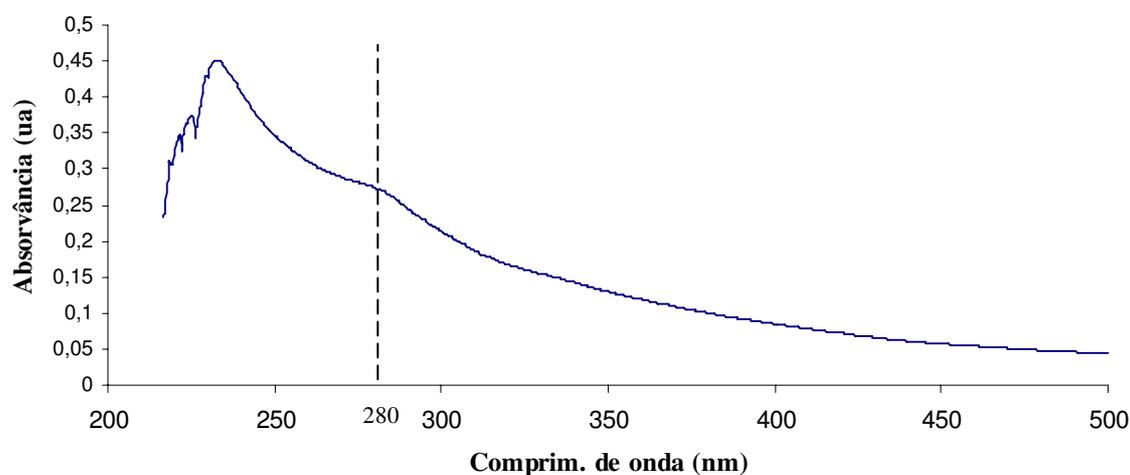
A viscosidade da pasta é uma medida que permite avaliar o comprimento médio da cadeia de celulose (grau de polimerização). É determinada a partir da dissolução da pasta numa solução de CED. Altas viscosidades indicam elevados graus de polimerização da celulose e, conseqüentemente, a presença de pastas fortes e resistentes.[92]. O valor de viscosidade encontrado para as pastas obtidas por cozimento oxidativo com Pa foi de  $350 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Este valor quando comparado com valores de viscosidade de pastas kraft ou sulfito é um valor relativamente baixo, o que pode significar que o tratamento foi muito agressivo, causando a degradação das cadeias de celulose. Vários parâmetros podem causar a diminuição da viscosidade das pastas, como concentração de Pa utilizada, temperatura, tempo de reacção e pH, sendo por isso importante controlar esses parâmetros de modo a obter pastas com maiores viscosidades. É de referir que a pasta apresentou bastante dificuldade em se dissolver na solução de CED, não se dissolvendo completamente, apesar se ter aumentado o tempo de agitação para 2 horas (a Norma SCAN recomenda cerca de 20 minutos). Este facto pode ter contribuído para a baixa viscosidade. Outra explicação é o facto da pasta obtida por cozimento oxidativo ser constituída por celulose e hemiceluloses, nomeadamente, xilanas. As hemiceluloses possuem graus de polimerização muito inferiores ao da celulose levando à diminuição da viscosidade das pastas.

### Lenhina Residual

O teor de lenhina residual na pasta foi determinado recorrendo à espectrofotometria de ultravioleta/visível. Esta técnica é muito utilizada na análise qualitativa e quantitativa da lenhina em soluções. Devido à natureza aromática da lenhina, esta apresenta uma forte absorvância na região do ultravioleta (UV). As unidades *p*-hidróxifenilo, guaiacilo e seringilo têm diferentes absorções máximas no espectro de UV. A absorvância máxima para as unidades guaiacilo e seringilo ocorre a 280 e 270 nm, respectivamente. O local onde a absorvância é máxima depende do tipo de lenhina, das modificações químicas e do solvente utilizado [93].

Para a determinação do teor de lenhina residual nas pastas, efectuou-se as leituras das absorvâncias, num espectrofotómetro *scanning*, entre 205 e 500 nm. A Figura 27 apresenta

o espectro obtido na região ultravioleta/visível da pasta dissolvida na solução de cadoxeno e água.



**Figura 27:** Espectro do UV-VIS da pasta dissolvida na solução de cadoxeno.

Para a determinação da concentração de lenhina (g/L), foi necessário determinar a absorvidade molar a 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) (ver secção 2.3.2.1). O valor obtido para a  $\epsilon_{280}$  foi de  $15,4 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ver Tabela 22). Este valor é muito semelhante aos valores obtidos de absorvidade molar a 280 nm para a lenhina residual em pastas kraft de *E. globulus* e de resinosas (ver Tabela 22) [70].

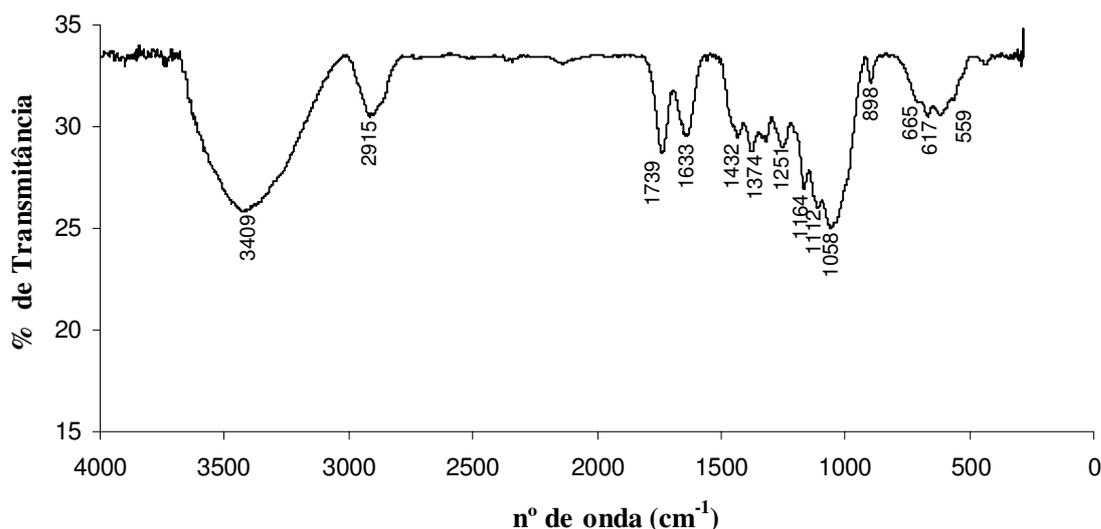
**Tabela 22:** Coeficientes de absorção de lenhinas residuais [70].

	$\epsilon_{280}$ ( $\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
Lenhina residual de pastas de <i>E. globulus</i>	17,3
Lenhina residual de pastas de resinosas	18,6
Lenhina residual de pastas de engaçó	15,4

Com o valor da absorvância a 280 nm e da  $\epsilon_{280}$  determinou-se o teor de lenhina residual na pasta. O valor de lenhina residual rondou os 2-3%, sendo um valor aceitável, quando comparado com valores de lenhina residual em pastas kraft de *E. globulus* e de resinosas mencionados na literatura [70].

### 5.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

Na Figura 28 é apresentado o espectro de FTIR da pasta obtida a partir do engajo pelo cozimento oxidativo com ácido peracético, e na Tabela 23 estão referenciadas as principais bandas.



**Figura 28:** Espectro de FTIR da pasta obtida por cozimento oxidativo com Pa.

A análise do espectro permite observar uma banda bastante intensa a cerca de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , característica da elongação O-H de grupos álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos. Observa-se também a banda a  $2915\text{ cm}^{-1}$  atribuída à elongação C-H em grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ . Para além destas bandas, este espectro apresenta bandas muito bem definidas numa região entre  $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ , região muitas vezes designada de região “impressão digital”. As bandas assinaladas nesta região são: a banda a  $1739\text{ cm}^{-1}$  atribuída a uma elongação C=O de grupos acetilos nas xilanas (hemiceluloses); a banda a  $1633\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a estruturas oxidáveis de polissacarídeos; a banda a  $1374\text{ cm}^{-1}$  específica da deformação simétrica C-H na celulose e hemiceluloses; a banda a  $1251\text{ cm}^{-1}$  atribuída à elongação C=O em ésteres, possivelmente nas xilanas; e a típica banda a  $898\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação C-H na celulose.

No entanto, a análise deste espectro permitiu deduzir que o tratamento com ácido peracético é realmente eficaz na deslenhificação do engajo da uva, uma vez que não observamos as bandas típicas da lenhina ( $1612$ ,  $1531$ ,  $1370$ , e  $1270\text{ cm}^{-1}$ ) identificadas no espectro FTIR do engajo da uva (Figura 18 da secção 3.2).

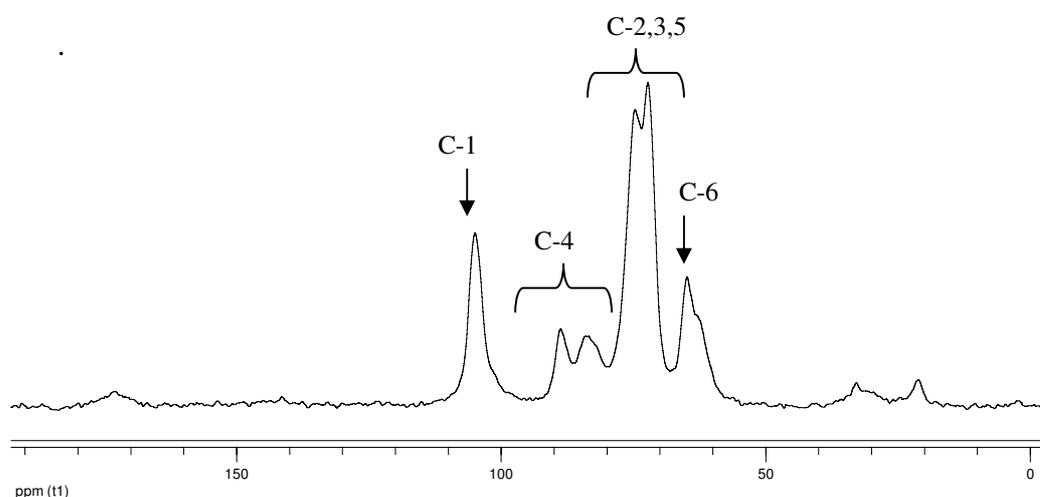
**Tabela 23:** Atribuições das bandas no infravermelho da pasta [32, 94-96].

$\text{cm}^{-1}$	Atribuição
3409	$\nu$ OH de álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos
2915	$\nu_{\text{a}}$ CH em $\text{CH}_3$ e $\text{CH}_2$ alifáticos
1739	$\nu$ C=O de grupos acetilos I
1633	$\nu$ C=C conjugada com C=O, ou com anel aromático em estruturas diénicas
1432	$\delta$ $\text{CH}_2$
1374	$\delta_{\text{s}}$ C-H atribuído à celulose e hemiceluloses
1251	$\nu$ C-O em ésteres
1164	$\delta$ C-O confirmação da presença de lenhina, polissacarídeos
1058	$\delta$ C-O ou $\delta$ C-C éter ou éster
898	$\delta$ C-H na celulose; presença de ligações glicosídicas na celulose e hemicelulose
665	$\omega$ C-OH
617	$\omega$ C-H (aromático) em lenhinas

( $\nu$ ) - elongação; ( $\nu_{\text{s}}$ ) - elongação simétrica; ( $\nu_{\text{a}}$ ) - elongação assimétrica; ( $\delta$ ) - deformação angular; ( $\delta_{\text{s}}$ ) - deformação angular simétrica; ( $\delta_{\text{a}}$ ) - deformação angular assimétrica; ( $\omega$ ) - deformação angular fora do plano.

### 5.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS

A Figura 29 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da pasta e as atribuições dos sinais detectados estão referidas na Tabela 24.

**Figura 29:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da pasta obtida por cozimento oxidativo com Pa.

Pela análise deste espectro verifica-se que a pasta resultante do cozimento oxidativo com Pa é essencialmente constituída por celulose e xilanas. Este facto vem de encontro com a análise dos açúcares da pasta (secção 5.1), onde se verificou que os açúcares maioritários eram a glucose (proveniente da celulose) e a xilose (proveniente das xilanas). Este espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS também vem consolidar as conclusões obtidas pelo espectro de FTIR, na medida em que não se observam sinais típicos de lenhinas, o que permite concluir que o cozimento com Pa é eficaz, removendo a maior parte da lenhina, uma vez que ainda se determinou 2-3 % de lenhina residual na pasta.

**Tabela 24:** Atribuições dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da pasta obtida por cozimento oxidativo com Pa [81].

$\delta$ (ppm)	Atribuição
21	$\text{CH}_3$ em $\text{CH}_3\text{COO}-$
25-35	$\text{CH}_3$ e $\text{CH}_2$ em cadeias alifáticas
60-70	C-6 da celulose; C-5 da xilanas
70-81	C-2,3,5 da cellulose; C-2,3,4 da xilanas
81-93	C-4 da celulose
102-108	C-1 da celulose; C-1 da xilanas
174	$\text{C}=\text{O}$ em $\text{CH}_3\text{COO}-$

## 5.2 Modificação das pastas por acetilação parcial

As pastas obtidas por tratamento oxidativo com ácido peracético foram sujeitas a uma modificação química por acetilação parcial em fase heterogénea (ver secção 2.4). Esta acetilação parcial teve como objectivo obter fibras de celulose parcialmente acetiladas de modo a serem biodegradáveis ( $\text{DS} < 2,2$ ) e ao mesmo tempo compatíveis com matrizes poliméricas. No entanto, é importante mencionar que outros componentes da pasta (hemiceluloses e lenhina residual) também são passíveis de acetilação.

A modificação química das pastas por acetilação parcial ocorreu a diferentes tempos de acetilação, isto é, acetilou-se as pastas durante 2, 5, 15, 30 e 60 minutos. Os diferentes tempos de acetilação tiveram como objectivo determinar os diferentes graus de

substituição do material final e inferir acerca das suas aplicações e da biodegradabilidade. É importante referir que o objectivo desta acetilação parcial é o de obter graus de substituição entre 1 e 2 de modo a obter materiais biodegradáveis.

### 5.2.1 Caracterização química das pastas parcialmente acetiladas

Primeiramente determinou-se o grau de substituição e a percentagem de acetilação das pastas parcialmente acetiladas, e de seguida procedeu-se à caracterização por análises térmicas (TGA e DSC) e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS).

#### 5.2.1.1 Grau de substituição

Após modificação química das pastas por acetilação parcial em fase heterogénea, as pastas parcialmente acetiladas a diferentes tempos, foram avaliadas relativamente: à sua percentagem de acetilação (%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e ao seu grau de substituição (DS), através de uma caracterização volumétrica (ver secção 5.2.1.1) (Tabela 25).

**Tabela 25:** Grau de substituição (DS) para os diferentes tempos de acetilação da pasta.

Tempo de reacção	DS	% $\text{CH}_3\text{COOH}$
2 min	1,43	29,30
5 min	1,48	30,32
15 min	2,10	43,02
30 min.	2,15	44,05
60 min	2,21	45,27

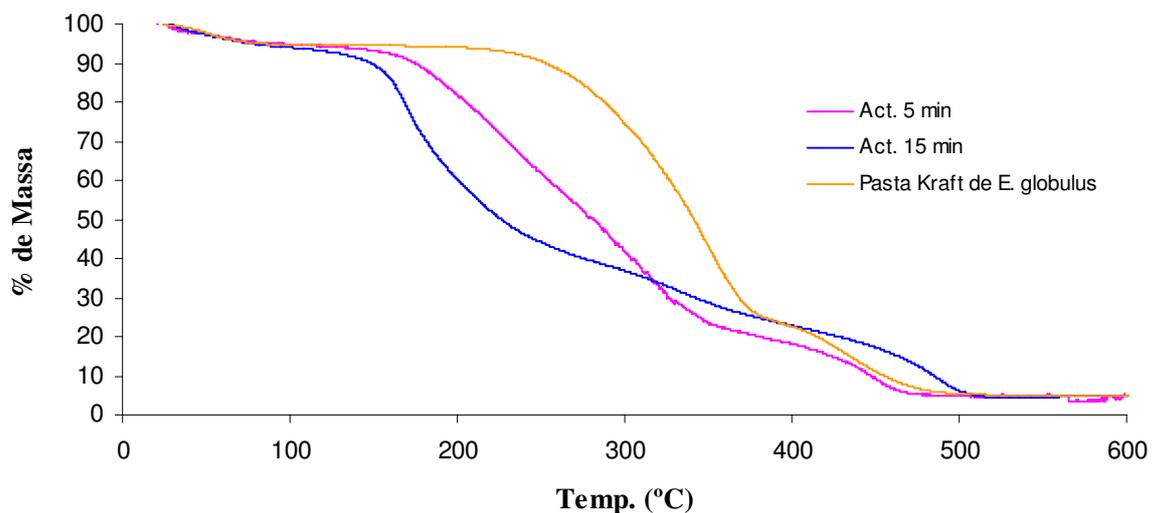
Pela análise da Tabela 25 foi possível verificar o aumento gradual do grau de substituição dos grupos OH da cadeia de celulose e da percentagem em massa dos grupos acetilo, à medida que aumenta o tempo de reacção. É de notar, no entanto, que o principal aumento ocorre entre os 5 e 15 minutos, com um aumento de cerca de 13% na percentagem de acetilação. Como já foi referido na secção 1.5.1.1, o aumento do DS provoca uma menor afinidade para os solventes mais polares, podendo mesmo não

alcançar a solubilidade. Este facto é reflexo da diminuição do número de grupos hidrofílicos (OH) livres na cadeia de celulose. Pela análise da tabela conclui-se que acima dos 15 minutos de acetilação pode-se correr o risco de obter-se elevados graus de substituição. Como o objectivo da acetilação parcial é obter materiais biodegradáveis, verificamos que a acetilação durante 2 e 5 minutos é a mais aconselhada, uma vez que se observou com sucesso numa modificação superficial das fibras de celulose.

No estudo da solubilidade dos materiais verificamos que são fortemente entumecidos em acetona. Através dos DS obtidos podemos depreender acerca das suas aplicações (ver Tabela 6 da secção 1.5.1.1), podendo ser aplicados em compósitos ou plásticos.

### 5.2.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada para avaliar as propriedades térmicas das pastas acetiladas durante 5 e 15 minutos. Para comparação dos resultados efectuou-se uma análise termogravimétrica de uma pasta kraft de *E. globulus*. A Figura 30 apresenta-nos as curvas de perda de massa dos referidos materiais.

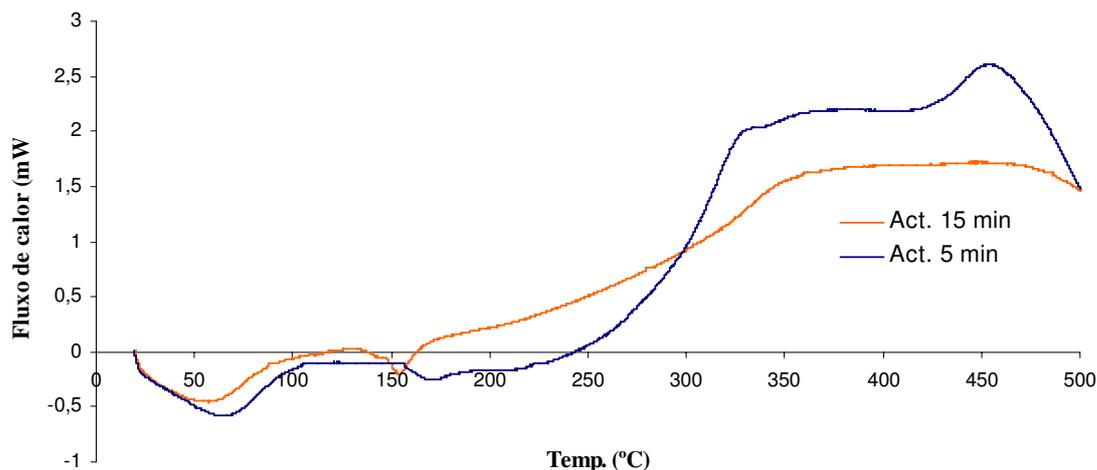


**Figura 30:** Curvas termogravimétricas para a pasta acetilada a 5 e 15 minutos, e para uma pasta kraft de *E. globulus*.

Segundo a literatura, a degradação térmica dos materiais lenhocelulósicos ocorre em três estágios de perda de massa [97]. O primeiro estágio ocorre perto dos 100 °C e está associado à evaporação de compostos voláteis ou água residual absorvida. O segundo estágio observa-se entre 260 e 440°C, e está relacionado com a rotura das cadeias de celulose [98]. O terceiro estágio encontra-se acima dos 500 °C e corresponde à carbonização dos produtos em cinza. Pela observação dos termogramas podemos verificar que os três materiais em análise apresentam as três fases. A pasta kraft de *E. globulus* apresenta o comportamento semelhante à decomposição térmica das fibras de celulose [99], com uma temperatura máxima de decomposição a 353°C. Nas pastas acetiladas a 5 e 15 minutos o segundo estágio tem início a temperaturas mais baixas, a cerca de 150°C para a pasta acetilada a 15 minutos e a 170°C para a pasta acetilada a 5 minutos. Neste estágio ocorre a perda dos grupos acetilos e a rotura das cadeias de celulose [98]. A estabilidade térmica das fibras de celulose é afectada pelo grau de cristalinidade, que diminui após a substituição dos grupos hidroxilos por ácidos orgânicos. Deste modo, a estabilidade térmica dos ésteres de celulose é mais baixa do que a da celulose [99]. Por outro lado, o aumento do grau de substituição provoca um aumento da temperatura de degradação dos ésteres de celulose, como verificamos na Figura 30, uma vez que a pasta acetilada a 15 minutos apresenta uma degradação mais lenta a partir dos 330°C, comparativamente com a pasta kraft de *E. globulus*. Este melhoramento da estabilidade térmica dos ésteres de celulose pode ser explicado pela formação de novas ordens estruturais nas regiões substituídas [99].

### 5.2.1.3 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica usada no estudo das transições térmicas dos materiais. A análise DSC permite determinar as temperaturas onde ocorrem as transformações de fases, observadas através da perda e/ou ganho de calor, complementando a análise termogravimétrica. A Figura 31 apresenta as curvas de DSC para as pastas acetiladas a 5 e 15 minutos.

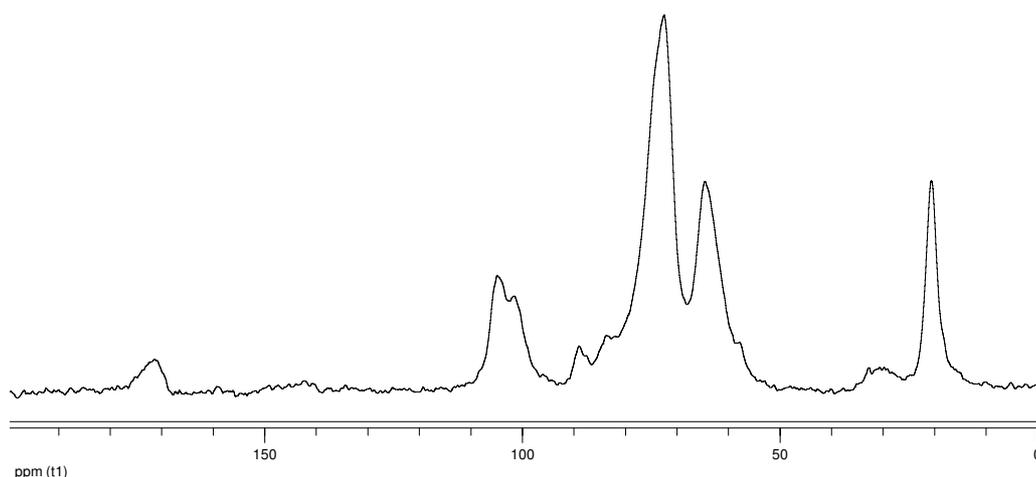


**Figura 31:** Curvas de DSC para as pastas acetiladas a 5 e 15 minutos.

Pela análise das curvas DSC representadas na Figura 31 verifica-se que ambas as pastas acetiladas (5 e 15 minutos) apresentam um pico endotérmico entre 50 e 70°C. Este pico é atribuído à evaporação de compostos voláteis ou água residual absorvida, observado também no TGA a cerca de 100°C. A cerca de 150°C e 170°C observam-se as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) correspondentes à pasta acetilada a 15 minutos e a 5 minutos, respectivamente. A degradação térmica na pasta acetilada durante 15 minutos começa a cerca de 180°C, enquanto que para a pasta acetilada durante 5 minutos, a degradação térmica começa por volta dos 230°C. Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos por TGA, na medida em que a pasta acetilada a 15 minutos (>DS) começa a degradar-se mais cedo do que a pasta acetilada a 5 minutos.

#### 5.2.1.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN de $^{13}\text{C}$ CP/MAS

O RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS mostra-nos a possibilidade e a aplicabilidade na caracterização estrutural dos diferentes tipos de derivados de celulose [100]. A Figura 32 apresenta-nos o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da pasta acetilada durante 5 minutos e na Tabela 26 podemos observar as atribuições dos sinais detectados.



**Figura 32:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da pasta acetilada a 5 minutos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da celulose não modificada consiste na visualização de seis sinais, um sinal para cada átomo de carbono. Os sinais C-1, C-4 e C-6 são facilmente visualizados, no entanto os sinais do C-2, C-3 e C-5 muitas vezes apresentam problemas de resolução devido à proximidade entre eles. Após a reação de acetilação o espectro continua a apresentar seis sinais característicos da celulose, mas observam-se diferenças nos desvios químicos em comparação com espectros de celulose não modificada. Normalmente os carbonos mais envolvidos nos desvios químicos são os C-2, C-3 e C-6, e menos significativamente os C-1, C-4 e C-5. Geralmente, na celulose parcialmente acetilada pode-se observar a presença de dois sinais para o C-1 e para o C-6, e na celulose totalmente acetilada (triacetatos) apenas se observa um sinal para o C-1 e para o C-6 [101].

No entanto, pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da pasta acetilada a 5 minutos verificou-se a presença de dois sinais para o C-1 (a presença destes dois sinais para o C-1 da pasta acetilada não foram observados na pasta celulósica -Figura 29). A visualização deste desvio químico observado para o C-1 (existência de dois sinais a 102 e 104 ppm para a celulose parcialmente acetilada) vem comprovar que o grupo OH na posição C-2 foi acetilado provocando um desvio químico. Relativamente ao C-6 não se observou dois sinais, mas observou-se um aumento da intensidade do sinal quando comparado com a pasta celulósica (Figura 29). Este aumento de intensidade, aliado à presença de um único sinal, sugere que os grupos OH na posição 6 foram totalmente acetilados. Outro aspecto que permitiu concluir que a pasta foi parcialmente acetilada é o facto do sinal correspondente ao C-4 (a cerca de 89 ppm) da celulose cristalina, diminuiu de

intensidade, isto é, ocorreu um decréscimo do grau de cristalinidade, aumentando por sua vez o domínio amorfo.

Pela observação do espectro também verificou-se a presença de um sinal muito intenso a 21 ppm característicos dos grupos CH<sub>3</sub> em CH<sub>3</sub>COO. Este sinal intenso também permitiu concluir que a celulose foi acetilada parcialmente.

De um modo geral os grupos OH nas posições 2 e 6 foram acetilados preferencialmente. A acetilação parcial do grupo OH na posição 3 é mas difícil de ocorrer uma vez que o grupo OH na posição 3 está envolvido nas ligações por pontes de hidrogénio [101]. Através da observação do espectro não se pode verificar se os grupos OH na posição 3 foram acetilados. Contudo, a literatura diz-nos que o C-3 da celulose acetilada ocorre a cerca de 76 ppm, e este sinal foi detectado no espectro [101].

**Tabela 26:** Atribuições dos sinais de RMN de <sup>13</sup>C CP/MAS da pasta acetilada a 5 minutos [100-102].

$\delta$ (ppm)	Atribuição
21	CH <sub>3</sub> em CH <sub>3</sub> COO-
61-64	C-6 da celulose acetilada; C-5 das xilanas
72-76	C-2,3 da celulose acetilada; C-5 na celulose; C-2,3,4 das xilanas
84-89	C-4 na celulose
102-104	C-1 na celulose; C-1 das xilanas
172	C=O em CH <sub>3</sub> COO-

O estudo sobre a composição química do engaço da uva, assim como as suas possíveis valorizações, são ainda temas pouco desenvolvidos, verificando-se assim alguma carência bibliográfica sobre ao assunto. No entanto, este trabalho permitiu retirar algumas conclusões acerca da composição química do engaço e investigar algumas aplicações:

1. O estudo sobre a composição química do engaço revelou-nos que a celulose é o componente polimérico maioritário (30,3%), seguindo-se as hemiceluloses insolúveis em água quente (21%) e a lenhina (17,4%). O valor obtido para o teor de cinzas (7,0%) é concordante com valores obtidos por outros autores para engaços da uva de outras castas. Relativamente ao teor de extractáveis em água quente (23,7%), observou-se que estes compostos estão presentes em quantidades muito superiores, comparativamente aos valores encontrados para as madeiras e noutras plantas anuais como o caso do kenaf e da bananeira. Este elevado valor pode ser explicado pela presença de taninos (15,9%), elevada quantidade de cinzas e de substâncias pécnicas em quantidades consideráveis. Baseando-se na análise dos monossacarídeos verificou-se que as xilanas são o segundo polissacarídeo maioritário no engaço depois a celulose (cerca de 12%).

2. A celulose do engaço da uva apresentou-se como típica Celulose I, com elevado grau de cristalinidade (75,4%). Este valor encontrado é superior aos graus de cristalinidade encontrados para a celulose nas madeiras (63-68%).

3. A lenhina do engaço da uva foi isolada na forma de lenhina-dioxano e caracterizada estruturalmente. Dos diferentes estudos conclui-se que a lenhina do engaço é de tipo GS, com elevada abundância das unidades guaiacilo. A razão encontrada entre as unidades H, G e S foi de 3:71:26. O teor de grupos metóxilos por unidade fenil propano (UFP) corresponde a 1,23 OCH<sub>3</sub>/UFP. Verificou-se também que as estruturas  $\beta$ -O-4 e  $\beta$ -5 são as mais abundantes, e que se trata de uma lenhina muito condensada, e portanto menos reactiva quando sujeita a processos de deslenhificação. O peso molecular médio ponderado ( $M_w$ ) foi de 2600 Da, valor típico para lenhinas-dioxano de plantas anuais e de madeira.

4. Relativamente ao cozimento kraft do engaço da uva, verificou-se que o engaço não pode ser deslenhificado por este método, uma vez que o resíduo insolúvel em ácido aumentou de 17,4% na matéria-prima para 33,3 % no material obtido após o cozimento. O facto do cozimento kraft mostrar-se ineficaz na deslenhificação pode ser explicado pela estrutura da lenhina, e pela elevada presença de taninos que possivelmente condensaram com a lenhina, impedindo a deslenhificação. Uma possível solução que não foi testada e que poderá obter resultados mais promissores é a realização de uma extracção alcalina prévia antes do cozimento kraft, com vista à remoção dos taninos.

5. Foi comprovada uma possibilidade de deslenhificação do engaço da uva pelo método oxidativo com ácido peracético. O ácido peracético mostrou-se, por sua vez, bastante eficiente na deslenhificação do engaço e no branqueamento da pasta obtida. As condições foram optimizadas de modo a obter maiores rendimentos (35-38%) e pastas com menores teores de lenhina residual (cerca de 2-3%). A viscosidade intrínseca das pastas foi relativamente baixa (menor de que  $400 \text{ cm}^3/\text{g}$ ), quando comparado com pastas kraft de folhosas ou resinosas. A baixa viscosidade intrínseca pode ser explicada pelo facto de o tratamento ter sido muito agressivo degradando parte dos polissacarídeos, mas também pelo facto da pasta ser constituída por elevado teor de xilanas.

6. Foi estudada a possibilidade da acetilação parcial das fibras celulósicas do engaço, em meio heterogéneo. A acetilação parcial foi efectuada a diferentes tempos de reacção (entre 2 a 60 minutos), e consequentemente obtiveram-se graus de substituição entre 1,43 e 2,21. Conclui-se que os tempos de reacção 2 e 5 minutos são os mais adequados para se obter materiais potencialmente biodegradáveis (com graus de substituição inferiores a 2,0). A análise estrutural revelou-nos que os grupos OH nas posições 2 e 6 foram acetilados preferencialmente. Verificou-se também que a Tg da pasta acetilada durante 15 minutos (DS = 2,10) ocorre a  $150^\circ\text{C}$  e a Tg da pasta acetilada durante 5 minutos (DS = 1,48) ocorre a  $170^\circ\text{C}$ , concluindo-se que à medida que aumenta o grau de substituição verifica-se uma diminuição da Tg.

7. De um modo geral, os resultados obtidos neste trabalho permitiram demonstrar que o engaço da uva é um material de natureza lenhocelulósica, com potencial na produção de pasta celulósica e na obtenção de novos materiais, como compósitos. No entanto, a obtenção de pastas celulósicas pelos métodos convencionais (kraft) mostrou-se

impraticável. Uma vez que o engaço da uva é um material muito difícil de deslenhificar, torna-se portanto necessário investigar outros métodos de produção de pasta, como por exemplo o método termo-mecânico ou químico-termo-mecânico.

Este trabalho, além de aprofundar os conhecimentos ao nível da caracterização química do engaço da uva, nomeadamente, no que diz respeito à estrutura da lenhina (uma vez que a literatura é muito escassa), permitiu investigar o potencial do engaço da uva na obtenção de pasta celulósica. No entanto, outros aspectos que não foram abordados neste trabalho merecem ser alvo de futuras investigações:

- Isolamento e caracterização das xilanas;
- Optimização do cozimento oxidativo com Pa ou outros reagentes oxidativos;
- Estudo das propriedades mecânicas das fibras e aplicabilidade das pastas na produção de pasta de papel;
- Ensaio em vários tipos de compósitos da pasta parcialmente acetilada.



## Bibliografia

1. Matos, A.T., Tratamento de resíduos agroindustriais, in *Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais*, **2005**, Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Engenharia Agrícola e Ambiental, Brasil.
2. Silva, L.M.R., Aproveitamento de Subprodutos da Vinificação, in *Seminário do Curso de Mestrado em Controlo da Qualidade*, **2001**, Universidade do Porto, Porto.
3. Instituto da Vinha e do Vinho. Maio 2008. Available at URL: <http://www.ivv.min-agricultura.pt>
4. Vitivinicultura - Diagnóstico Sectorial, Gabinete de planeamento e políticas, **2007**, Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
5. Para um sector vitivinícola sustentável, Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu, **2006**, Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas, (PT) Com (final) 319, pp. 1-13.
6. Instituto Nacional de Estatística. Maio **2008**. Available at URL: <http://www.ine.pt>.
7. Spigno, G., Pizzorno, T. and De Faveri, D.M., Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology*, **2008**, 99(10): pp. 4329-4337.
8. Guerra, L., O Processo de Vinificação em Tinto - Método Tradicional, in *Departamento de Engenharia Química*, **2005**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
9. Peynaud, E., Conhecer e Trabalhar o Vinho, **1993**, Lisboa: Litexa Editora, Lda.
10. Silva, J.M.R., Composição da Uva, do Mosto e do Vinho, in *100º Curso Intensivo de Vinificação*, **2006**, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
11. Dias, J.P., Fases de Maturação da Uva, in *Centésimo Curso Intensivo de Vinificação*, **2006**, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
12. Navarre, C., L'œnologie. 3ª édition, Lavoisier-Tec & Doc, **1994**, Paris.
13. Vasco, P., Gama, F.M. and Coimbra, M.A., Caracterização dos polissacarídeos das paredes celulares da grainha de uva com vista à valorização do óleo por aplicação de enzimas exógenas, in *6º Encontro de Química de Alimentos*, **2000**, Lisboa.
14. Costa, M., Aproveitamento de Subprodutos da Vinificação. O Bagaço como Matéria-Prima da Indústria de Óleos e de Fabrico de Rações para Gado, in *1º Congresso Nacional das Industrias Agro-Alimentares*, **1983**, Ministério da Agricultura Comércio e Pescas.
15. Regulamento (CE) nº 1493/1999 do Conselho, **1999**, Jornal Oficial das Comunidades Europeias (PT) L179, pp.1-84.
16. Santos, J.Q. and Campos, L.S., Possibilidade de Aproveitamento do Bagaço de Uva como Fertilizante, in *Congresso 86*, Ordem dos Engenheiros, **1986**, Lisboa.
17. Farinella, N.V., Matos, G.D. and Arruda, M.A.Z., Grape bagasse as a potential biosorbent of metals in effluent treatments. *Bioresource Technology*, **2007**, 98(10): pp. 1940-1946.
18. Miralles, N., et al., Grape Stalks Waste as Low Cost Biosorbents: An Alternative for Metal Removal from Aqueous Solutions. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, **2008**, 26(3): pp. 261 - 270.

19. Fiol, N., Escudero, C. and Villaescusa, I., Chromium sorption and Cr(VI) reduction to Cr(III) by grape stalks and yohimbe bark. *Bioresource Technology*, **2008**, 99(11): pp. 5030-5036.
20. Cruz, J.M., Dominguez, H. and Parajo, J.C., Assessment of the Production of Antioxidants from Winemaking Waste Solids. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52(18): pp. 5612-5620.
21. Ribéreau-Gayon, P., et al., Red Winemaking, in *Handbook of Enology -The Microbiology of Wine and Vinifications*, **2000**, Jonh Wiley & Sons, LTD. Cap 12, pp 295 -348.
22. Bertran, E., et al., Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource Technology*, **2004**, 95(2): pp. 203-208.
23. Ferrer, J., et al., Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technology*, **2001**, 76(1): pp. 39-44.
24. Delaunay, J.-C., et al., Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2002**, 964(1-2): pp. 123-128.
25. Spigno, G. and De Faveri, D.M., Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, **2007**, 78(3): pp. 793-801.
26. Bustamante, M.A., et al., Short-term carbon and nitrogen mineralisation in soil amended with winery and distillery organic wastes. *Bioresource Technology*, **2007**, 98(17): pp. 3269-3277.
27. Goldstein, I.S., Overview of chemical composition of wood, in *Wood Structure and Composition*, Lewin M. and Goldstein, I.S. Editors, **1991**, Marcel Dekker, Inc. Cap 1, pp. 1-6.
28. Pettersen, R.C., The Chemical Composition of Wood, in *The Chemistry of Solid Wood*, Rowell, R.M. Editor, **1984**, American Chemical Society: Washington, Cap 2, pp. 57-126.
29. Sjöstrom, E., Wood Polysaccharides in *Wood Chemistry – Fundamentals and Applications*, **1993**, Academic Press, INC. Cap 3, pp. 51-70.
30. Klemm, D., et al., Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44: pp. 3358-3393.
31. McGinnis, G.D. and Shafizadeh, F., Cellulose, in *Wood Structure and Composition*, Lewin M. and Goldstein, I.S. Editors, **1991**, Marcel Dekker, Inc., Cap 4, pp. 139-181.
32. Hult, E.-L., Iversen, T. and Sugiyama, J., Characterization of the supermolecular structure of cellulose in wood pulp fibres. *Cellulose*, **2003**,10(2): pp. 103-110.
33. Pinto, P.C., Evtuguin, D.V. and Neto, C.P., Effect of Structural Features of Wood Biopolymers on Hardwood Pulping and Bleaching Performance. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2005**, 44(26): pp. 9777-9784.
34. Klemm, D., et al., General Considerations on Structure and Reactivity of Cellulose, in *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and analytical methods 1*, **1998**, Wiley-VCH: Weinheim. Cap 2, pp. 9-166.
35. Kontturi, E.J., Surface Chemistry of Cellulose: from natural fibres to model surfaces, in *Eindhoven University of Technology*, **2005**, Eindhoven University of Technology: Eindhoven.
36. Herman, M.F., Lignin, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **2004**, John Wiley & Sons. Vol 3, pp. 100-124.

37. Xu, F., et al., Comparative Study of Three Lignin Fractions Isolated from Mild Ball-Milled Tamarix austromogoliac and Caragana sepium. *Journal of Applied Polymer Science*, **2008**, 108: pp. 1158-1168.
38. Morais, S.A.L., Nascimento, E.A., and Melo, D.C., Análise da Madeira do Pinus oocarpa Parte II - Caracterização Estrutural da Lignina da Madeira Moída. *Revista Árvore*, **2005**, 29: pp. 471-478.
39. Boerjan, W., J. Ralph, and M. Baucher, Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, **2003**. 54(1): pp. 519-546.
40. Sjöstrom, E., Lignin, in *Wood Chemistry - Fundamentals and Applications*, **1993**, Academic Press, INC: Londres. Cap 4, pp. 71-88.
41. Ralph, J., et al., Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews*, **2004**, 3(1): pp. 29-60.
42. Whistler, R.L. and Chen, C.-C., Hemicelluloses, in *Wood Structure and Composition*, Lewin M. and Golstein, I.S. Editors, **1991**, Marcel Dekker, Inc. Cap 7, pp. 287-320.
43. Jeffries, T.W., Biodegradation of lignin and hemicelluloses, **1994**: Academic Publishers. pp. 233-277.
44. Cosgrove, D.J., Assembly and Enlargement of the Primary Cell Wall in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **1997**. 13(1): pp. 171-201.
45. Sjöstrom, E., Wood Pulping in *Wood Chemistry – Fundamentals and Applications*. **1993**, Academic Press, INC. Cap 7, pp. 114-161.
46. Smook, G., Overview of Pulping Methodology, in *Handbook for Pulp & Paper Technologists*, G. Smook, Editor, **1992**, Angus Wilde Publications: Vancouver. Cap 4, pp. 38-44.
47. Clayton, D., et al., Overview, in *Pulp and Paper Manufactures, Vol.5: Alkaline Pulping*. **1989**. Cap 1, pp. 3-14.
48. Smook, G., Kraft Pulping, in *Handbook for Pulp & Paper Technologists*, Smook, G., Editor, **1992**, Angus Wilde Publications: Vancouver. Cap 7, pp. 75-84.
49. Biermann, C.J., Pulping Fundamentals in *Handbook of Pulping and Papermaking*., **1996**, Academic Press: San Diego. Cap 3, pp. 91-97.
50. Muurinen, E., Organosolv Pulping - A review and distillation study related to peroxyacid pulping, in *Department of Process Engineering*, **2000**, University of Oulu: Finland.
51. Sun, R., et al., Delignification of Maize Stems by Peroxymonosulfuric Acid, Peroxyformic Acid, Peracetic Acid, and Hydrogen Peroxide. 1. Physicochemical and Structural Characterization of the Solubilized Lignins. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48: pp. 1253-1262.
52. Brasileiro, L.B., Colodette, J.L. and Piló-Veloso, D., A utilização de Perácidos na Deslignificação e no Branqueamento de Polpas Celulósicas. *Química Nova*, **2001**, 24: pp. 819-829.
53. Sundquist, J. and Poppius-Levlin, K., Milox Pulpung and Bleaching, in *Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry*, Young, R.A. and Akhtar, M. Editors, **1998**, Jonh Wiley & sons, Inc. pp. 133-156.
54. Widsten, P., Hortling, B. and Poppius-Levlin, K., Reactions of Conventional Kraft and Superbatch Pulp Residual Lignins with Peroxyformic Acid. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **2003**, 23: pp. 305-323.
55. Gandini, A., et al., Direct transformation of cellulose fibres into self-reinforced composites by partial oxypropylation. *Polymer*, **2005**, 46(24): pp. 10611-10613.
56. Sjöstrom, E., Cellulose Derivates in *Wood Chemistry – Fundamentals and Applications*, **1993**, Academic Press, INC. Cap 9, pp. 204-217.

57. Brydson, J.A., Cellulosic Plastics, in *Plastic Materials*, **1999**, British Library Cataloguing in Publication Data. Cap 22, pp. 613-634.
58. Herman, M.F., Cellulose Esters, Inorganic, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **2004**, John Wiley & Sons, INC. Vol 9, pp. 113-128.
59. Wadsworth, L.C. and D. Daponte, Cellulose esters in *Cellulose Chemistry and its applications*, Nevell, T.P. and Zeronian, S.H. Editors, **1985**, John Wiley & Sons. Cap 15, pp. 363-383.
60. Herman, M.F., Cellulose Esters, Organic, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **2004**, John Wiley & Sons, INC. Vol 9, pp. 129-157.
61. Mohanty, A.K., et al., Development of Renewable Resource-Based Cellulose Acetate Bioplastic: Effect of Process Engineering on the Performance of Cellulosic Plastics. *Polymer Engineering and Science*, **2003**, 43 (5): pp. 1151-1161.
62. Herman, M.F., Cellulose Fibers, Regenerated, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. **2004**, John Wiley & Sons, INC. pp. 532-566.
63. Feller, R.L.W., Myron, H., Evaluation of cellulose ethers for conservation Research in conservation, **1990**, The Getty Conservation Institute. Cap 2, pp. 9-36.
64. Fujimoto, J., et al., Formação de Multicamadas de Polissacarídeos e Proteínas. *Química Nova*, **2002**, 25(5): pp. 757-761.
65. Ruzene, D., et al., Carboxymethylcellulose obtained by ethanol/water organosolv process under acid conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2007**, 137-140(1): pp. 573-582.
66. Neto, C.P., et al., Chemical composition and structural features of the macromolecular components of Hibiscus cannabinus grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, **1996**, 5(3): pp. 189-196.
67. Evtuguin, D.V., et al., Comprehensive Study on the Chemical Structure of Dioxane Lignin from Plantation Eucalyptus globulus Wood. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(9): pp. 4252-4261.
68. Tanahashi, M. and T. Higuchi, Chemical Degradation Methods for Characterization of Lignins, in *Methods in Enzymology*, J.N. Abelson and M.I. Simon, Editors, **1988**, Academic Press, Inc: New York, USA. Cap13, pp. 101-136.
69. Rebuzzi, F. and Evtuguin, D.V., Effect of Glucuronoxylan on the Hornification of Eucalyptus globulus Bleached Pulps. *Macromol. Symp.* , **2006**, pp. 121-128.
70. Evtuguin, D.V., Silvestre, A.I.D. and Neto, C.P., Determination of Hexenuronic Acid and residual lignin in pulps by UV spectroscopy in cadoxen solutions. *Journal of Pulp and Paper Science*, **2002**, 28: pp. 189-192.
71. Easty, D.B. and Thompson, N.S., Wood Analysis, in *Wood Structure and Composition*, M. Lewin and I.S. Goldstein, Editors, **1991**, Marcel Dekker, Inc. Cap 3, pp. 49-138.
72. Lundkvist, H. and Eriksson, H.M., Wood Ash Recycling in Sweden—Planning and Design, **2007**, *Department of Ecology and Environmental Research*. Cap 19, pp.119-122.
73. Perkiömäki, J., Wood ash use in coniferous forests - A soil microbiological study into the potential risk of cadmium release, in *Academic dissertation in Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry*, **2004**, University of Helsinki, Helsinki.
74. Klock, U., et al., Química da Madeira, in *Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal*, **2005**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
75. Silvério, F.O., et al., Metodologia de extração e determinação do teor de extractivos em madeiras de eucalipto *Revista Árvore*, **2006**, 30 (6): pp.1009-1016.

76. Hernes, P.J. and Hedges, J.I., Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2004**. 68(6): pp. 1293-1307.
77. Pandey, K.K. and Pitman, A.J., Examination of the Lignin Content in a Softwood and a Hardwood Decayed by a Brown-Rot Fungus with the Acetyl Bromide Method and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Polymer Science*, **2004**, 42: pp. 2340-2346.
78. Uçar, G., et al., Analytical pyrolysis and FTIR spectroscopy of fossil *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) wood and MWLs isolated hereof. *Holz als Roh- und Werkstoff*, **2005**. 63(1): pp. 57-63.
79. Oliveira, L., et al., Chemical composition of different morphological parts from 'Dwarf Cavendish' banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. *Industrial Crops and Products*, **2007**, 26: pp. 163-172.
80. Saliba, E.O.S., et al., Ligninas- Métodos de Obtenção e Caracterização Química. *Ciência Rural*, **2001**, 31(5): pp. 917-928.
81. Atalla, R.H. and VanderHart, D.L., The role of solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **1999**. 15(1): pp. 1-19.
82. Faix, O., Fourier Transform Infrared Spectroscopy, in *Methods in Lignin Chemistry*, Lin, S.Y. and Dence, C.W., Editors, **1992**, Springer-Verlag. pp. 83-109.
83. Ibarra, D., et al., Chemical characterization of residual lignins from eucalypt paper pulps. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2005**, 74: pp. 116-122.
84. Hergert, H.L., in *Lignins*, Sarkanen, K.V., Ludwing, C.H., Editors, **1971**, Wiley-Interscience: New York, pp. 267.
85. Robert, D., Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, in *Methods in Lignin Chemistry*, Lin, S.Y. and Dence, C.W., Editors, **1992**, Springer-Verlag, pp. 250-273.
86. Chen, C.-L., Lignins: Occurrence in Woody Tissues, Isolation, Reactions, and Structure, in *Wood Structure and Composition*, Lewin, M. and Goldstein, I.S., Editors, **1991**, Marcel Dekker, Inc. Cap 5, pp. 183-262.
87. Chen, C.L., Nitrobenzene and Cupric Oxide Oxidations, in *Methods in Lignin Chemistry*, S.Y. Lin and C.W. Dence, Editors, **1992**, Springer-Verlag. pp. 301-321.
88. Pepper, J.M., Baylis, P.E.T. and Alder, E., The Isolation and Properties Obtained by the Acidolysis of spruce and Aspen woods in Dioxane-Water Medium. *Canadian Journal of Chemistry*, **1959**. 37: pp. 1241-1248.
89. Lundquist, K., Acidolysis, in *Methods in Lignin Chemistry*, Lin, S.Y. and Dence, C.W., Editors, **1992**, Springer-Verlag.
90. Lundquist, K., Proton ( $^1\text{H}$ ) NMR Spectroscopy, in *Methods in Lignin Chemistry*, S.Y. Lin and C.W. Dence, Editors, **1992**, Springer-Verlag. pp. 242-249.
91. Ede, R.M. and Ralph, J., Assignment of 2D TOCSY Spectra of Lignins: the Role of Lignin Model Compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1996**. 34: pp. 261-268.
92. Biermann, C.J., in *Handbook of Pulping and Papermaking*, **1996**, Academic Press: San Diego. Cap 6, pp. 137-157.
93. Lin, S.Y., Ultraviolet Spectrophotometry, in *Methods in Lignin Chemistry*, S.Y. Lin and C.W. Dence, Editors, **1992**, Springer-Verlag. Cap 5.1, pp. 217-232.
94. Jackson, M.J. and Line, M.A., Organic Composition of a Pulp and Paper Mill Sludge Determined by FTIR,  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR, and Chemical Extraction Techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**. 45: pp. 2354-2358.

95. Silva, M.C. and Silva, G.G., A New Composite from Cellulose Industrial Waste and Elastomeric Polyurethane. *Journal of Applied Polymer Science*, **2005**, 98: pp. 336-340.
96. Hassan, M.L., et al., Thermoplasticization of Bagasse. I. Preparation and Characterization of Esterified Bagasse Fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, **2000**, 76: pp. 561-574.
97. Hanna, A.A., et al., Thermal properties of cellulose acetate and its complexes with some transition metals. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1998**, 260: pp. 1-4.
98. Meireles, C.S., et al., Blend Compatibility of Waste Materials -Cellulose Acetate (from Sugarcane Bagasse) with Polystyrene (from Plastic Cups): Diffusion of Water, FTIR, DSC,TGA, and SEM Study. *Journal of Applied Polymer Science*, **2007**,104: pp. 909-914
99. Jandura, P., B. Riedl, and B.V. Kokta, Thermal degradation behavior of cellulose fibers partially esterified with some long chain organic acids. *Polymer Degradation and Stability*, **2000**, 70(3): pp. 387-394.
100. Myamoto, T., et al., <sup>13</sup>C-NMR studies of some cellulose derivates, in *Wood and Cellulosics*, J.F.Kennedy, G.O.Phillips, and P.A.Williams, Editors, **1987**, Jonh Wiley & Sons. Cap 66, pp. 597-604.
101. Klemm, D., et al., Analytical Methods in Cellulose Chemistry, in *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and analytical methods 1*. **1998**, Wiley-VCH: Weinheim. Cap 3, pp. 167-222.
102. Barud, H.S., et al., Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. *Thermochimica Acta*, **2008**, 471(1-2): pp. 61-69.