



Universidade de Aveiro Departamento de Química

2010

**SANDRA CRISTINA
TAVARES DE
OLIVEIRA**

**EFEITO DO TRATAMENTO HIPERBÁRICO NA
HIDRÓLISE DE PASTA KRAFT COM XILANASE**



**SANDRA CRISTINA
TAVARES DE
OLIVEIRA**

**EFEITO DO TRATAMENTO HIPERBÁRICO NA
HIDRÓLISE DE PASTA KRAFT COM XILANASE**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Dmitry Victorovitch Evtyugin, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão como forma de agradecimento por todo o apoio, carinho e compreensão que têm demonstrado ao longo de todo o meu percurso académico.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco

Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Dmitry Victorovich Evtugin

Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Eng. José Luís Amaral

Director de I&D tecnológico do Instituto de Investigação da Floresta e do Papel (RAIZ), Eixo

Agradecimentos

“Não há nada que esteja só; nada pode estar em completa solidão: o que existe necessita de outro para ser.”

(Leopoldo Schfer)

As minhas primeiras palavras de agradecimento vão para os meus orientadores, Doutor Dmitry Victorovitch Evtugin e Doutor Jorge Saraiva por todo o estímulo, disponibilidade e conhecimento transmitido ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço também aos meus pais, Francisco e Rosa e ao meu irmão Carlos, sem eles jamais seria possível.

Os meus mais sinceros agradecimentos para com os amigos, que me acompanharam em toda esta longa jornada de trabalho, em especial à Raquel, Vera e Pedro.

Quero também expressar as minhas palavras de agradecimento para com a Andreia, Sónia, Joana, Elisabete e Mickael que em muito me ajudaram na realização deste estudo.

Agradeço ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho, e a todos com os quais convivi ao longo dos anos, professores e funcionários, pela ajuda e amizade.

Palavras-chave

Pasta kraft, xilanas, hidrólise enzimática, xilanase, alta pressão hidrostática

Resumo

O principal objectivo deste trabalho consistiu no estudo da influência do tratamento hiperbárico na hidrólise enzimática de xilanas presentes na pasta kraft de *Eucalyptus globulus* branqueada. A hidrólise foi efectuada utilizando uma *endo* enzima (EC 3.2.1.8) proveniente do fungo *Thermomyces lanuginosus* designada comercialmente por Pentopan Mono BG. Previamente à reacção de hidrólise, a pasta celulósica foi submetida a pressões entre 200-400 MPa durante intervalos de 15 e 45 minutos. A formação de açúcares redutores foi quantificada ao longo do tempo de reacção pelo método de DNS. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento a alta pressão é responsável por promover um aumento da intensidade de hidrólise enzimática no intervalo de pressões entre 200 e os 400 MPa. A melhor combinação pressão/tempo foi obtida para a pressão de 400 MPa e para 15 minutos de pré-tratamento. Para esta pasta, nos primeiros 15 minutos de reacção, observou-se um aumento da quantidade de açúcares redutores formados de cerca de 850% face à pasta sem pré-tratamento hiperbárico.

A análise microscópica das fibras hidrolisadas desta amostra de pasta pré-pressurizada revelou que a superfície das fibras celulósicas aparenta estar gelificada com uma camada larga e transparente, que pode ser interpretada como sendo um indicador de perda de integridade das microfibrilas.

Ficou provado que o pré-tratamento de pastas celulósicas com alta pressão provoca uma maior acessibilidade das fibras face à hidrólise enzimática com xilanase, permitindo degradar fracções de xilanas mais inacessíveis. Sendo assim, o pré-tratamento hiperbárico pode ser considerado como um instrumento interessante na engenharia das reacções enzimáticas de pastas celulósicas, pois variando as pressões e os tempos de tratamento consegue-se controlar a intensidade da hidrólise enzimática.

Este trabalho mostrou que o pré-tratamento hiperbárico de pastas celulósicas é uma alternativa viável face aos métodos de hidrólise enzimática convencionais, pois permite superar os entraves existentes na actualidade em termos de rendimento de degradação de xilanas, permitindo ainda o controlo da extensão da reacção de hidrólise.

Keywords

Kraft pulp, xylan, enzymatic hydrolysis, xylanase, high hydrostatic pressure

Abstract

The main objective of this work was to study the influence of hyperbaric treatment in the enzymatic hydrolysis of xylan present in *Eucalyptus globulus* kraft bleached pulp. The hydrolysis was performed using an *endo* enzyme (EC 3.2.1.8) from the fungus *Thermomyces lanuginosus*, commercially known as Pentopan Mono BG. Prior to the reaction, the cellulosic pulp was subjected to pressures between 200-400 MPa during 15 or 45 minutes. The formation of reducing sugars was quantified along the reaction time by the method of DNS. The results demonstrate that the treatment the high pressure is responsible for promoting an increase of the enzymatic hydrolysis intensity in the interval of pressures between the 200 and 400 MPa. The best combination pressure/time was obtained for the pressure of 400 MPa and 15 minutes of treatment. For this case, in the first 15 minutes of reaction, there was an increased amount of reducing sugars formed from about 850%, comparing with the pulp that was not subjected to the hyperbaric treatment.

Microscopic analysis of the hydrolysed kraft pulp fibers pre-treated at 300 MPa during 45 minutes revealed that the surface of cellulosic fibers appears to be gelled with a broad and transparent layer that can be interpreted as indicator of loss of the integrity of microfibrils.

It was proven that the hyperbaric pre-treatment of pulps promotes an increase in the accessibility of the fibers towards the enzymatic hydrolysis with xylanase, enabling the degradation of the more inaccessible xylan fractions. Thus, the hyperbaric treatment can be considered as a useful tool in the engineering of the enzymatic reactions of cellulosic pulps, because varying the pressure and the pressurization time of the pre-treatment it is possible to control the extension of the enzymatic hydrolysis.

This study showed that the pre-hyperbaric treatment of cellulosic pulp represents a viable alternative compared to the conventional methods of enzymatic hydrolysis allowing to overcome the actual problems in terms of the limited performance of degradation of xylans.

Símbolos e Abreviaturas

Abs_{1cg}	Primeira leitura de absorvância com o valor do branco subtraído
Abs_{2cg}	Segunda leitura de absorvância com o valor do branco subtraído
Ac	Acetilo
Act_{reactor1}	Actividade enzimática de acordo com a primeira leitura de absorvância
Act_{reactor2}	Actividade enzimática de acordo com a segunda leitura de absorvância
Araf	Arabinofuranose
b	Ordenada na origem da recta de calibração de glucose
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
E	Enzima
ES	Complexo enzima – substrato
E_x	Teor de extractáveis (%)
G	Guaiacilo
Galp	Galactopirranose
GC	Grau de cristalinidade
[Glc]_{final1}	Concentração final de glucose de acordo com a primeira leitura de absorvância
[Glc]_{final2}	Concentração final de glucose de acordo com a segunda leitura de absorvância
Glcp	Glucopirranose
GP	Grau de polimerização
H	<i>p</i> -hidroxifenilo
HPP	Alta pressão hidrostática
LM	Lamela média
LMC	Lamela média composta
m	Declive da recta de calibração de glucose
m_{amostra}	Massa de pasta pesada
m_{amostra húmida}	Massa da amostra antes de ir à estufa
m_{amostra seca}	Massa da amostra após permanência na estufa

manp	Manopirranose
m_{cinzas}	Massa de cinzas
m_{extractáveis}	Massa de extractáveis
M(Glc)	Massa molecular de glucose
m(Glc)_{tubo1}	Massa de glucose presente na alíquota retirada do reactor de acordo com a primeira leitura de absorvância
m(Glc)_{tubo2}	Massa de glucose presente na alíquota retirada do reactor de acordo com a segunda leitura de absorvância
média_{Glc}	Média do número de moles de glucose no reactor para as duas leituras de absorvância efectuadas
MeGlcAp	Ácido 4- <i>O</i> -metil- α -D-glucopiranosilurónico
n(Glc)_{reactor1}	Numero de moles de glucose presentes no reactor de acordo com a primeira leitura de absorvância
n(Glc)_{reactor2}	Numero de moles de glucose presentes no reactor de acordo com a segunda leitura de absorvância
NSSC	Semi – químico neutral sulfito
P	Produto
PP	Parede primária
S	Seringilo
St	Substrato
t_r	Tempo de reacção
V_{DNS}	Volume de DNS
V_{H2O}	Volume de água
V_{tubo}	Volume de amostra no tubo
W	Teor de humidade (%)
WRV	Índice de retenção de água
Xylp	Xilopirranose
Z	Teor de cinzas (%)

Índice

Símbolos e Abreviaturas.....	XIII
Índice	XV
Índice de Figuras	XVIII
Índice de Tabelas	XXI
Introdução.....	1
Capítulo I Revisão Bibliográfica.....	3
1. A importância da indústria papelreira no panorama nacional.....	3
1.1. Composição química da madeira	3
1.1.1. Celulose.....	4
1.1.1.1. Estrutura morfológica da fibra celulósica.....	5
1.1.1.2. Estrutura supramolecular da fibra celulósica.....	6
1.1.2. Hemicelulose.....	7
1.1.2.1. Hemiceluloses de folhosas.....	8
1.1.2.2. Hemiceluloses de resinosas	10
1.1.3. Lenhina.....	11
1.2. Processos de obtenção de pastas celulósicas.....	13
1.3. Introdução à estrutura e mecanismo enzimático	14
1.3.1. Hemicelulases	16
1.3.1.1. Enzimas xilanolíticas: endo – 1,4 – β – xilanase.....	16
1.3.2. Aplicações industriais das enzimas na indústria papelreira	18
1.3.3. Hidrólise enzimática vs hidrólise ácida.....	19
1.3.4. Aspectos a ter em conta na hidrólise enzimática de pastas celulósicas	20
1.3.5. Pré-tratamentos que auxiliam a hidrólise enzimática.....	21
1.4. Processamento por alta pressão hidrostática (HHP)	21

1.4.1. O sistema de alta pressão	22
1.4.2. Princípios do método de alta pressão hidrostática (HHP).....	23
1.4.3. Impacto do processamento por alta pressão hidrostática na fibra celulósica....	24
Capítulo II Material e Métodos	27
2. A pasta de <i>Eucalyptus globulus</i>	27
2.1. Análise química da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	27
2.1.1. Determinação do teor de humidade.....	27
2.1.2. Determinação do teor de extractáveis em acetona	28
2.1.3. Determinação do teor de cinzas	28
2.1.4. Determinação do teor de açúcares neutros.....	28
2.2. Hidrólise enzimática.....	30
2.2.1. Características da enzima utilizada	30
2.2.2. Hidrólise enzimática do xilano.....	30
2.2.2.1. A solução de xilano 1% (p/V) como substrato	30
2.2.2.2. Determinação da actividade enzimática da xilanase em xilano.....	31
2.2.3. Hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	32
2.2.3.1. A pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i> como substrato	32
2.2.3.2. Determinação da actividade enzimática da xilanase em pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	32
2.2.4. Hidrólise enzimática de pastas kraft de <i>Eucalyptus globulus</i> processada em alta pressão hidrostática (HHP)	33
2.2.4.1. Características e modo de operação do aparelho de alta pressão e preparação das amostras	33
2.2.4.2. Determinação da actividade enzimática de xilanase em pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i> pré-tratada em alta pressão.....	34
2.2.5. Sistema sinérgico entre a xilanase e a celulase na hidrólise de xilanas de pasta kraft pré-tratada a alta pressão	35

2.2.5.1. Características das enzimas utilizadas no sistema combinatório de hidrólise	35
2.2.5.2. Ação conjunta das enzimas xilanase e celulase na hidrólise da pasta kraft pré-tratada em alta pressão	35
2.3. Determinação do teor de açúcares neutros nas pastas kraft processadas a alta pressão após a hidrólise enzimática	36
Capítulo III Análise e Discussão de Resultados.....	37
3.1. Composição química da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	37
3.2. Hidrólise enzimática do xilano.....	38
3.3. Hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	40
3.4. Efeito do pré-tratamento de alta pressão hidrostática na pasta kraft.....	45
3.5. Teor de açúcares neutros da pasta kraft de <i>E. globulus</i> após hidrólise enzimática	54
3.6. Análise da imagem de suspensões de pastas kraft ao microscópio.....	56
Capítulo IV Conclusão	59
Bibliografia.....	61
Anexos.....	67
Anexo A: Tabelas auxiliares	67
Anexo B: Gráficos auxiliares	85
Anexo C: Metodologia de calculo.....	86

Índice de Figuras

Figura 1: Modelo estrutural da celulose	4
Figura 2: Representação esquemática dos constituintes da parede celular (A); Esquema da parede celular da fibra celulósica (B)	6
Figura 3: Representação esquemática da organização da fibra celulósica.....	7
Figura 4: Estrutura da 4- <i>O</i> -metil-glucuronoxilana.....	8
Figura 5: Estrutura da glucomana presente em madeiras de folhosas	9
Figura 6: Modelo estrutural da xilana principal do <i>Eucalyptus globulus</i>	9
Figura 7: Estrutura principal da <i>O</i> -acetil-galactoglucomanana em madeira de resinosas .	10
Figura 8: Estrutura principal da arabino-4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana em madeira de resinosas	11
Figura 9: Percursos das unidades fenilpropano da lenhina	11
Figura 10: Representação da estrutura da xilana e sítios onde as enzimas actuam.....	17
Figura 11: Esquema de um sistema de alta pressão hidrostática (HPP) por compressão directa (esquerda) e indirecta (direita).....	23
Figura 12: Representação esquemática do Princípio isostático	24
Figura 13: Representação esquemática do processo de cocristalização.....	25
Figura 14: Representação esquemática do processo de recristalização da celulose	25
Figura 15: Representação esquemática do procedimento adoptado para determinar a actividade da xilanase	32
Figura 16: Unidade principal do aparelho High Pressure U33	33
Figura 17: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o primeiro ensaio de hidrólise enzimática do xilano	39
Figura 18: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o segundo ensaio de hidrólise enzimática do xilano.....	40
Figura 19: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o primeiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	41
Figura 20: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o segundo ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	42

Figura 21: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o terceiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	43
Figura 22: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o quarto ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	44
Figura 23: Representação gráfica da quantidade de produto formado em função da concentração da solução enzimática para os tempos pré-estabelecidos e a relação linear entre a quantidade de açúcares redutores formados e o tempo de reacção para a concentração de solução enzimática intermédia.....	45
Figura 24: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 200MPa durante 45 minutos	46
Figura 25: Comparação da actividade enzimática da xilanase ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 200MPa durante 45 minutos	47
Figura 26: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 300MPa durante 15 e 45 minutos	48
Figura 27: Comparação da actividade enzimática da xilanase ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 300MPa durante 15 e 45 minutos	49
Figura 28: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 400MPa durante 15 e 45 minutos	50
Figura 29: Comparação da actividade enzimática da xilanase ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 400MPa durante 15 e 45 minutos	50
Figura 30: Representação gráfica da percentagem de aumento do produto formado relativamente à pasta sem pré-tratamento de alta pressão em função do tempo	51
Figura 31: Representação esquemática do efeito do processamento hiperbárico sobre a acessibilidade das microfibrilas de celulose face à hidrólise enzimática com xilanase	52
Figura 32: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo de reacção para as pastas processadas a 400MPa durante 15 minutos e hidrolisadas apenas pela xilanase e pela combinação xilanase/celulase.....	53

Figura 33: Observação microscópica da pasta sem tratamento de alta pressão 20 x (A), pasta pré-tratada a 200MPa durante 45 minutos 20 x (B), pasta pré-tratada a 300MPa durante 15 minutos 20 x (C) pasta pré-tratada a 300MPa durante 45 minutos 20 x (D), pré-tratada a 400MPa durante 15 minutos 20 x (E) 56

Figura 34: Observação ao microscópio do hidrolisado da pasta sem tratamento de alta pressão 10 x (A), hidrolisado da pasta sem tratamento de alta pressão 50 x (B), hidrolisado da pasta pré-tratada a 300 MPa durante 45 minutos 10 x (C), hidrolisado da pasta pré-tratada a 300 MPa durante 45 minutos 50 x (D) 57

Índice de Tabelas

Tabela 1: Abundância dos precursores da lenhina em porcentagem	12
Tabela 2: Tipos e abundâncias das principais ligações presentes na lenhina de resinosas e folhosas	12
Tabela 3: Características principais do aparelho High Pressure U33.....	34
Tabela 4: Gama de pressões e tempos de processamento a que foram submetidas as amostras	34
Tabela 5: Composição química da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	37
Tabela 6: Condições em que foi realizado o primeiro ensaio de hidrólise enzimática do xilano	38
Tabela 7: Condições em que foi realizado o segundo ensaio de hidrólise enzimática do xilano	39
Tabela 8: Condições em que foi realizado o primeiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	40
Tabela 9: Condições em que foi realizado o segundo ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	41
Tabela 10: Condições em que foi realizado o terceiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	42
Tabela 11: Condições em que foi realizado o quarto ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>E. globulus</i>	43
Tabela 12: Açúcares neutros presentes na pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i> submetida a diferentes condições experimentais	55

Capítulo I Revisão Bibliográfica

1. A importância da indústria papelreira no panorama nacional

Segundo dados de 2009 a floresta portuguesa ocupa 38,4 % de todo o território nacional. Para além dos aspectos ambientais relacionados com a renovação do ar a floresta portuguesa é cada vez mais um trunfo para a recuperação económica do país. Este facto deve-se ao montante envolvido nas transacções comerciais com o estrangeiro que ronda 3498 milhões de euros o que globalmente representa 9,4% do total de exportações de Portugal. Dos 9,4% referenciados metade diz respeito simplesmente a exportações referentes à indústria da pasta e do papel [1].

No que diz respeito à composição arbórea mais predominante em Portugal destacam-se principalmente três espécies que são responsáveis pela ocupação de 75% da área florestal portuguesa, o pinheiro bravo (*Pinus pinaster*), o sobreiro (*Quercus suber*) e os eucaliptos (*Eucalyptus spp*) [2]. A produção mundial de pasta de eucalipto situa-se nos 10 milhões de toneladas por ano e o ritmo de crescimento anual é cerca de 6% [3].

Actualmente, Portugal continua a ser o maior produtor mundial de pasta kraft branqueada obtida a partir desta madeira, sendo cerca de 40% desta pasta utilizada em fábricas integradas de pasta e papel nacionais [4].

1.1. Composição química da madeira

A madeira é um material composto essencialmente por fibras, cuja composição química não pode ser definida com precisão para uma dada espécie de árvores, pois varia com factores tais como o tipo de madeira, idade, parte da árvore (raiz, caule e folhas), localização geográfica, clima, condições do solo, entre outras. No entanto, e dependendo da espécie, a madeira possui uma parede celular constituída por cerca de 40-50% de fibrilas de celulose, embebidas numa matriz de hemiceluloses (20-35%) e lenhina (20-30%). Os restantes componentes, presentes em menor quantidade, são compostos de baixo peso molecular, geralmente designados por extractáveis (1-5%) e cinzas (< 1%) [5].

1.1.1. Celulose

A celulose é um polímero natural formado por aproximadamente 4000-10000 unidades de anidro D-glucopiranoses ligadas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), sendo que a variação do valor referido depende da fonte de que é oriunda a celulose [5].

A celulose é um homopolímero linear, tendo como unidade estrutural a celobiose que resulta da união de duas unidades de β -D-glucopiranosose desfasadas entre si 180°.

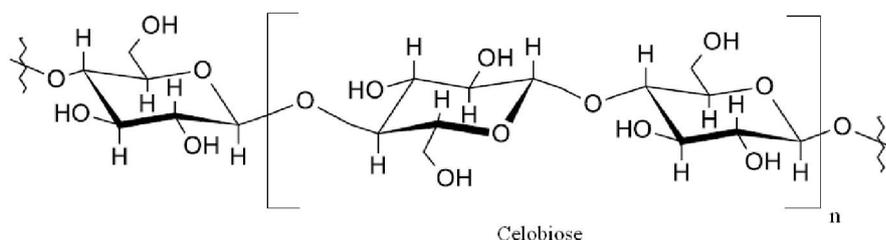


Figura 1: Modelo estrutural da celulose adaptado [6]

Este polímero possui três grupos hidróxilos livres, para efectuarem ligações por pontes de hidrogénio, (inter e intramolecular) situadas nos carbonos, 2, 3 e 6, o que lhe confere uma elevada resistência mecânica [7]. A cadeia de celulose possui extremidades com funções distintas. Uma das extremidades possui um grupo hidroxilo posicionado no carbono 1 com carácter redutor, enquanto que na outra extremidade, o grupo hidróxilo do carbono 4 apresenta características não redutoras. Esta diferença entre as duas extremidades da cadeia celulósica confere à celulose polaridade.

A presença de grupos OH na celulose e a proximidade entre as moléculas permite que se estabeleçam ligações por pontes de hidrogénio entre as cadeias de celulose que estão no mesmo plano. A celulose cria também ligações com as moléculas que se encontram noutros planos através de forças de Van der Waals. São estas ligações intra e inter planos que conferem à celulose uma estrutura coesa, compacta e ordenada que constitui a estrutura cristalina da celulose.

A celulose apresenta um comportamento hidrofílico, isto é, tem uma enorme tendência para absorver água mas, devido à sua estrutura amorfo-cristalina, esta penetra apenas nas zonas amorfas, pois só aí se encontram espaços vazios entre as moléculas, devido ao elevado grau de cristalinidade que as zonas cristalinas possuem. O grau de cristalinidade da celulose é definido como a proporção relativa de massa de celulose cristalina relativamente à massa total de celulose. O grau de cristalinidade da celulose, varia consoante a planta em

causa, essa variação é normalmente de 55 – 75%, situando-se em 60% no caso de madeiras e centrando-se nos 75% no caso do algodão.

1.1.1.1. Estrutura morfológica da fibra celulósica

A parede celular é constituída por vários elementos estruturais, tais como as microfibrilas de celulose e por elementos sub-estruturais como a hemicelulose e a lenhina como se pode observar na Figura 2 [8].

As microfibrilas de celulose são formadas por fibrilas elementares, estas ultimas, caracterizam-se por serem filamentos finíssimos constituídos por várias centenas de cadeias de celulose

No que diz respeito às hemiceluloses estas desempenham o papel de estabelecer a coesão entre as microfibrilas através do estabelecimento de ligações por pontes de hidrogénio. A lenhina é a matriz onde o sistema (microfibrilas + hemiceluloses) se encontra disperso.

A nível microscópica a parede celular apresenta o aspecto ilustrado na Figura 2. A lamela média (LM) estabelece a união entre as células individuais que compõem o tecido da parede celular. Na maioria das vezes esta estrutura é indistinguível da parede primária (PP), tomando o nome de lamela média composta (LMC) [8]. A lamela média possui uma espessura que varia entre 0,2 e 1,0 μm e é constituída essencialmente por lenhina embora, também possua hemiceluloses e pectinas principalmente na fase inicial da sua formação.

A parede primária (PP) apresenta uma espessura entre 0,1 μm e 0,2 μm e é formada por celulose, hemicelulose e pectina envolvidas numa matriz lenhosa. A celulose presente na parede primária está sob a forma de microfibrilas que apresentam diferentes orientações consoante se situam mais no interior (orientação perpendicular ao eixo da célula) ou exterior (orientação oblíqua) da parede primária.

Após a formação da parede primária começa a formar-se pelo lado interno desta a parede secundária sendo que esta é dividida em três subcamadas: a camada externa S1, a camada intermédia S2 e a camada interna S3 [9]. A parede secundária apresenta uma espessura que pode variar entre 1 a 10 μm e é preenchida por microfibrilas de celulose com orientações aleatórias que conferem solidez e flexibilidade à parede secundária. Para além de celulose estão também presentes na parede secundária hemiceluloses e lenhina. Por fim

forma-se na superfície interna da parede secundária a camada verrugosa que é descrita como uma membrana fina e amorfa constituída por um material semelhante à lenhina e por pequenas quantidades de hidratos de carbono e substâncias pécticas [8].

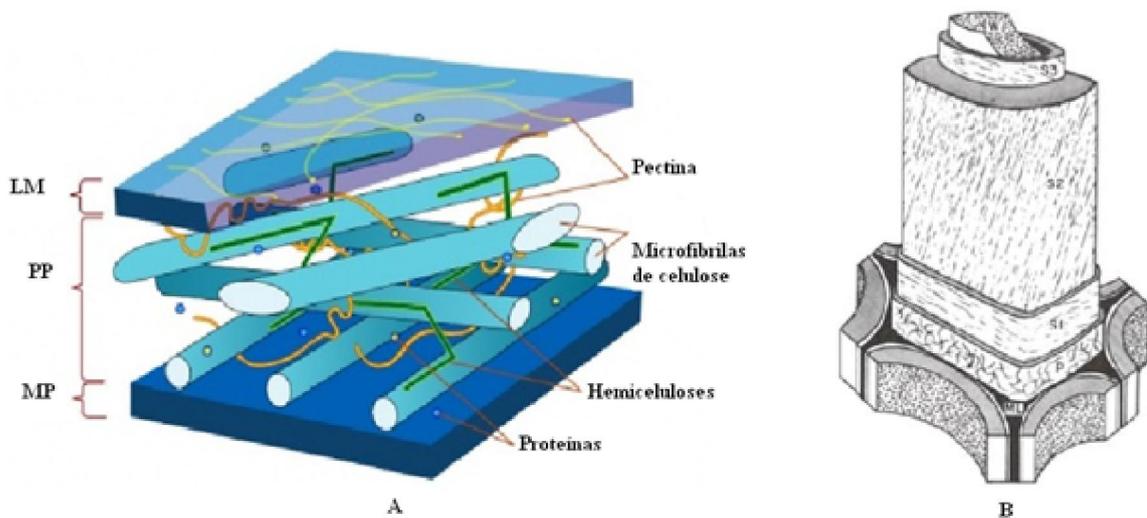


Figura 2: Representação esquemática dos constituintes da parede celular (A); Esquema da parede celular da fibra celulósica (B) adaptado [5], [10]

1.1.1.2. Estrutura supramolecular da fibra celulósica

A unidade básica da fibra de celulose é a fibrila elementar, esta deriva do estabelecimento de pontes de hidrogénio intra e intermoleculares. As forças de ligação intramoleculares, ocorrem entre os grupos hidróxilo da própria molécula de celulose e conferem-lhe propriedades de rigidez. Já as ligações intermoleculares surgem do estabelecimento de ligações entre os grupos hidroxilo de moléculas de celulose vizinhas. Este tipo de ligação é a principal responsável pelo elevado grau de cristalinidade da celulose. As fibrilas elementares são constituídas por regiões altamente ordenadas (cristalinas) interrompidas por zonas menos ordenadas (amorfas) [5], [11].

Da agregação da unidade básica da fibra celulósica surgem as microfibrilas sendo que estas apresentam na sua constituição zonas bastante organizadas (cristalitos de celulose ou celulose cristalina) e zonas de menor grau de organização (celulose amorfa). Da junção das microfibrilas formam-se as macrofibrilas e estas por sua vez culminam na fibra de celulose [12], [13].

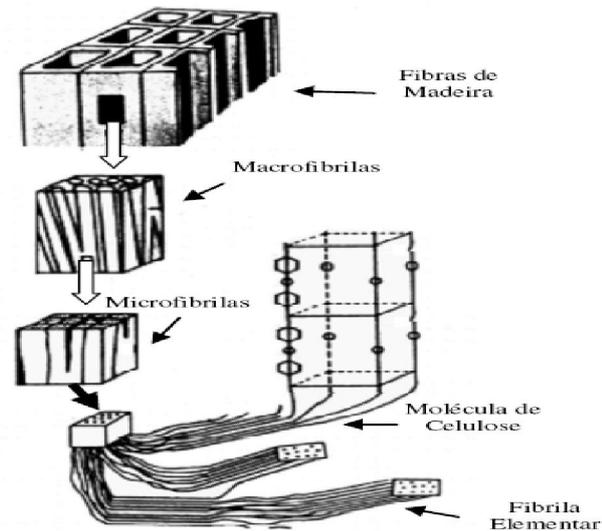


Figura 3: Representação esquemática da organização da fibra celulósica ^{adaptado [11]}

1.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses ou polioses são heteropolímeros com uma estrutura amorfa localizadas na parede celular tal como a celulose mas, com uma cadeia bem mais curta e ramificada que esta. Este constituinte químico da madeira apresenta-se numa percentagem de 20-35% em peso seco de madeira, dependendo este valor do tipo de espécie de madeira, sendo que normalmente a madeira de folhosas apresenta maior teor de hemiceluloses que as espécies de resinosas [9], [5].

O polímero hemicelulose apresenta um grau de polimerização (GP) entre 100 e 200 e é hidrolisado em meio ácido obtendo-se os seus elementos monoméricos principais, hexoses e pentoses na sua forma cíclica de pirano e furano, respectivamente. Encontram-se também para além dos monómeros anteriormente referidos outros de cariz ácido como os ácidos glucurónico e galacturónico [5]. Tal como acontece na celulose também nas hemiceluloses o grupo mais abundante é o grupo hidróxilo, embora também estejam presentes, grupos acetilo e carboxilo provenientes dos ácidos urónicos.

Podem ainda classificar-se as hemiceluloses de acordo com a unidade da cadeia principal em xilanas, mananas, xiloglucanas e glucanas.

1.1.2.1. Hemiceluloses de folhosas

As hemiceluloses maioritárias da madeira de folhosas são as glucuronoxilanas ou xilanas (20-35%) como também são denominadas e apresentam um GP entre 100 e 200 variando consoante a espécie [8].

Nas madeiras de folhosas cerca de 90% das hemiceluloses estão sobre a forma de *O*-acetil-4-*O*-metilglucurono- β -D-xilanas [7].

As *O*-acetil-4-*O*-metilglucurono- β -D-xilanas são constituídas por unidades de β -D-xilopiranosose ligadas linearmente entre si por ligações β (1 \rightarrow 4) [14].

As xilanas possuem nos carbonos 2 e/ou 3 grupos acetilo na proporção de 6 a 7 acetilos por cada 10 xiloses [5]. Estas xilanas encontram-se também ligadas ao ácido 4-*O*-metil - α -D-glucurónico (MeGlcA), por ligações α (1 \rightarrow 2). A razão entre os grupos MeGlcA e as unidades de D-xilopiranososes em média é de 1:10 [5].

Na Figura 4 apresenta-se a estrutura da principal hemicelulose presente em madeiras de folhosas.

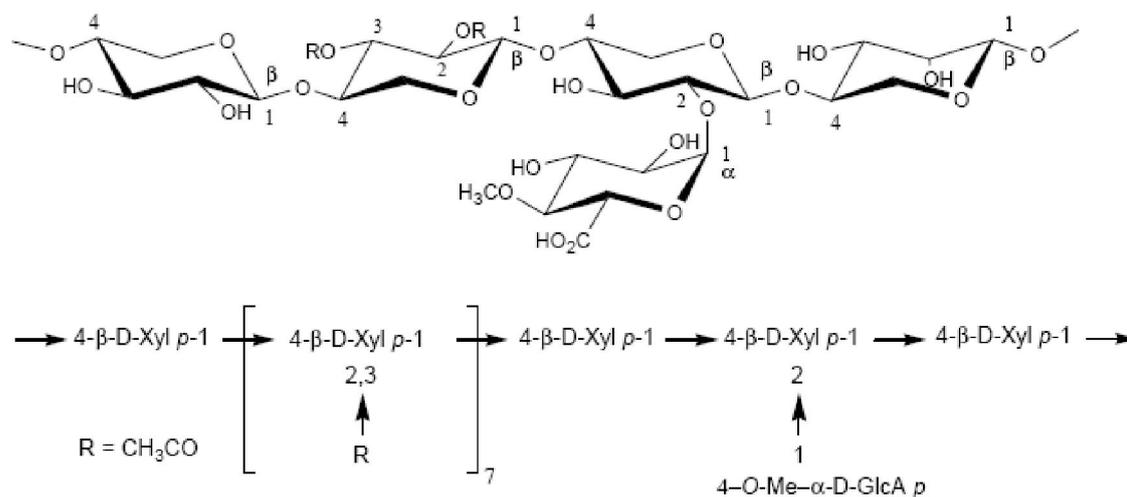


Figura 4: Estrutura da 4-*O*-metil-glucuronoxilana ^[15]

Para além de glucuronoxilanas as folhosas possuem também glucomanasas (Figura 5), sendo que estas estão presentes numa percentagem que vai dos 2-5% [5]. Esta hemicelulose é constituída por unidades de β -D-glucopiranosose e β -D-manopiranosose em que a proporção entre a glucose e a manose é de 1:1 ou 1:2, variando de acordo com a espécie em estudo.

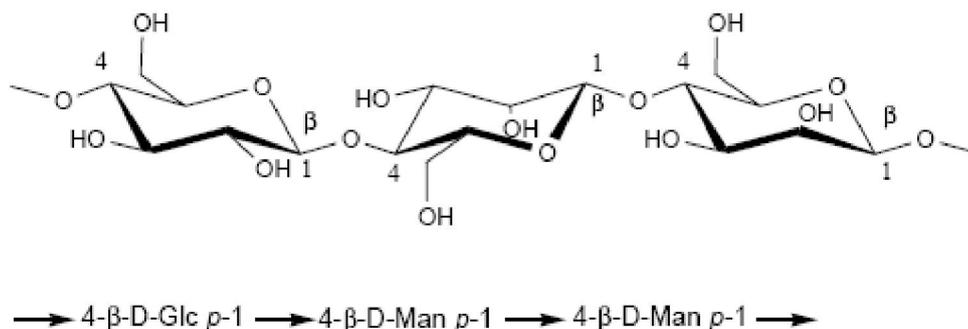


Figura 5: Estrutura da glucamana presente em madeiras de folhosas ^[15]

Olhando especificamente para a xilana do *E. globulus*, esta apresenta uma estrutura um pouco diferente quando comparada com as xilanas das outras folhosas e um GP de aproximadamente 160 [16].

As xilanas do *E. globulus* apresentam tal como as outras xilanas uma cadeia principal de unidades de β -D-xilopiranoose ligadas entre si por ligações β (1 \rightarrow 4) as quais possuem como substituintes grupos acetilo e o ácido 4-O-metil - α -D-glucurónico. A diferença consta, de que este último substituinte agora, está ligado na posição O-2 a unidades de galactose. Foi também detectada a presença ramnoarabinogalactanas e glucanas ligadas ao ácido 4-O-metil - α -D-glucurónico. É por este motivo que a xilana do *E.globulus* é tão complexa como se pode observar na Figura 6.

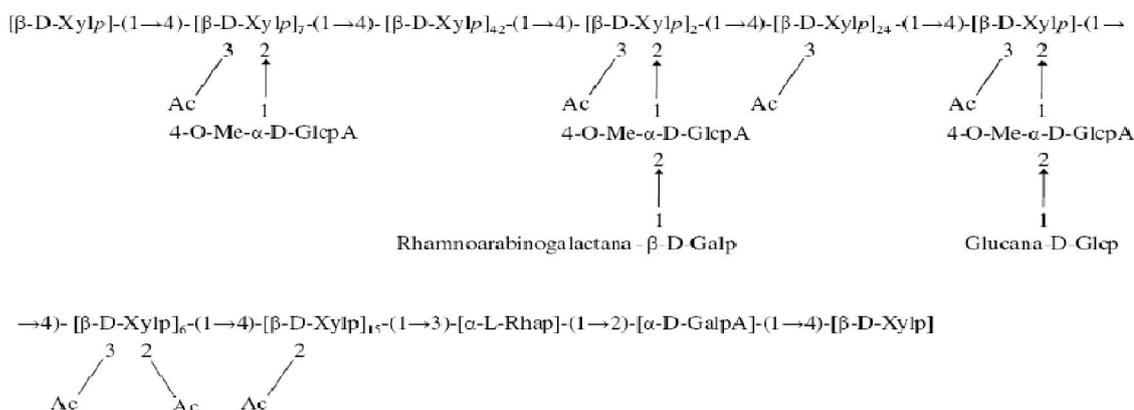


Figura 6: Modelo estrutural da xilana principal do *Eucalyptus globulus* ^[16]

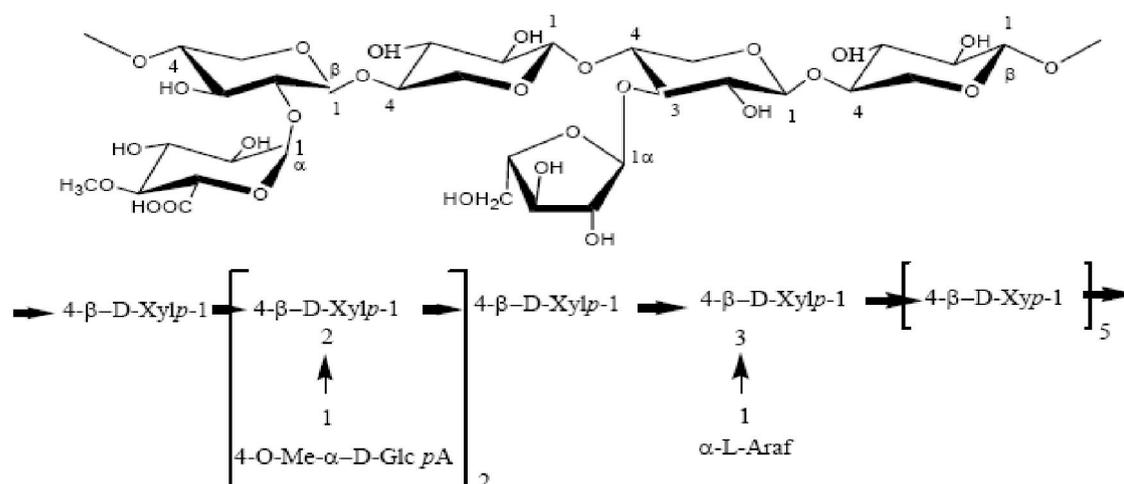


Figura 8: Estrutura principal da arabino-4-O-metilglucuronoxilana em madeira de resinosas [5]

1.1.3. Lenhina

A lenhina é a seguir à celulose o constituinte mais abundante na madeira e a sua constituição permaneceu durante muitos anos uma incógnita para a comunidade científica.

Em 1917, Peter Klason propôs que a lenhina poderia ser classificada como uma substância macromolecular constituída por unidades do álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool cumarílico dando origem a estruturas do tipo guaiacilo (G), seringilo (S) e *p*-hidroxifenilo (H), mantidas juntas através de ligações do tipo éter e C-C. A lenhina é uma macromolécula com a forma de uma rede polimérica tridimensional e não cristalina [9].

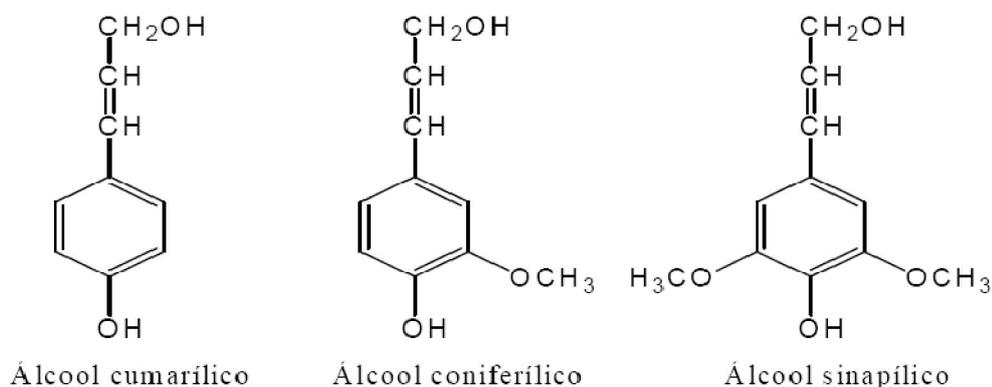


Figura 9: Percursos das unidades fenilpropano da lenhina [9]

A lenhina presente em folhosas denomina-se lenhina de guaiacilo-seringilo ou G/S pelo facto de ser constituída maioritariamente por unidades de álcoois coniferílico e sinapílico e a sua composição é aproximadamente 40-80% de unidades S, 20-60% de unidades G e 4-10% de unidades H.

Tabela 1: Abundância dos precursores da lenhina em percentagem ^[9]

Estruturas	Abundância em resinosas (%)	Abundância em folhosas (%)
G	95-98	20-60
H	2-5	4-10
S	-	40-80

Dentro das folhosas destaca-se o caso do *E. globulus* que apresenta como principal ligação a do tipo $\beta - O - 4$ (58%) e uma proporção de S: G: H de aproximadamente 84:15:1, o que demonstra que a lenhina do *E. globulus* é maioritariamente do tipo sinapílico.

Em madeira de resinosas a lenhina predominante é do tipo guaiacilo (G) sendo 95-98% de unidades G e 2-5% de unidades H.

As principais ligações presentes na lenhina são $\beta - O - 4$, $\beta - 5$ e $5 - 5$, sendo que a sua abundância na lenhina depende do tipo de madeira em questão. Deste modo para madeira de folhosas tem-se $\beta - O - 4$ (50-60%), $\beta - 5$ (2-4%) e $5 - 5$ (2-5%) enquanto, que na madeira de resinosas, a abundância das ligações é a seguinte $\beta - O - 4$ (40-48%), $\beta - 5$ (8-12%) e $5 - 5$ (9-18%).

Tabela 2: Tipos e abundâncias das principais ligações presentes na lenhina de resinosas e folhosas ^[9]

Tipo de ligação	Abundância em resinosas (%)	Abundância em folhosas (%)
$\beta - O - 4$	40 - 48	50 - 60
$\beta - 5$	8 - 12	2 - 4
$5 - 5$	9 - 18	2 - 5
$\alpha - O - 4$	4 - 8	4 - 8
$\beta - 1$	2 - 5	2 - 3
$4 - O - 5$	3 - 4	3 - 6
$\beta - \beta$	8 - 14	6 - 10

1.2. Processos de obtenção de pastas celulósicas

Para obtenção de pasta é necessário executar uma etapa denominada cozimento. O cozimento consiste na separação das fibras sendo que, para que esta separação seja feita, é necessário eliminar a lenhina que faz a união das fibras e ao mesmo tempo evitar (tanto quanto possível) a destruição de celulose e hemicelulose.

Os principais processos de obtenção de pasta são categorizados em processos químicos (sulfito ácido, bissulfito, kraft ou sulfato e soda), cujo rendimento se situa entre 35-65% semiquímicos (soda e sulfito neutro), que apresentam rendimentos na ordem dos 70-85% quimiomecânicos (quimiotermodomecânicos) com rendimentos na gama dos 85-95% e mecânicos (termomecânicos) com o maior rendimento cerca de 93 a 97% [5].

As pastas obtidas por processos mecânicos são as que apresentam maior rendimento em pasta, pois possuem um elevado teor de lenhina. Estas pastas são também coradas e exigem alto consumo de energia para a sua produção [5].

As pastas quimiomecânicas são as que possuem o segundo rendimento mais elevado e neste processo ocorre primeiro um tratamento com químicos (normalmente sulfito de sódio a temperaturas elevadas) e só depois é executada a desfibrilação por métodos mecânicos.

Seguidamente encontram-se as pastas obtidas por processos semiquímicos, onde o processo de cozimento mais usual é o semi – químico neutral sulfito (NSSC). Este tipo de cozimento utiliza o licor de cozimento do sulfito de sódio, tamponizado com carbonato de sódio, com o objectivo de neutralizar os ácidos orgânicos libertados pela madeira, durante o cozimento [19].

Por fim e com um rendimento mais baixo em pasta tem-se os processos químicos em que a remoção da lenhina já tem algum peso mas também acontece a dissolução de celulose e hemiceluloses.

A produção de pasta por processos químicos é usualmente utilizada, destacando-se entre estes processos, o processo ao sulfito ácido e o processo ao sulfato (kraft), sendo que neste trabalho o estudo será feito em pastas obtidas pelo processo ao sulfato.

O cozimento kraft é o processo mais recorrente tanto a nível nacional como internacional, este facto deve-se essencialmente à elevada resistência da pasta obtida, à multiplicidade da sua aplicação em diferentes espécies, à rapidez de ocorrência do processo, à tolerância do processo a resíduos existentes nas cascas das madeiras e por fim mas não menos importante à possibilidade de recuperação dos produtos químicos

envolvidos no processo **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** Os agentes activos do processo kraft são o hidróxido de sódio (NaOH) e o sulfureto de sódio (Na₂S).

A nível processual o que acontece é a submissão da mistura do licor de cozimento (licor branco) e das aparas a temperaturas e pressões elevadas de modo a favorecer a degradação da lenhina obtendo-se no final uma pasta crua constituída por celulose, fracções de hemiceluloses e alguma lenhina residual.

Ao longo do cozimento a interacção dos componentes da madeira com os reagentes do licor de cozimento, não é uniforme visto que, existe uma maior tendência para a degradação da lenhina, dos extractáveis e também das hemiceluloses, enquanto a celulose não é em grande medida afectada pelo cozimento de kraft.

Desta análise efectuada resulta um conflito porque, se por um lado com o processo de kraft se tem uma remoção elevada de lenhina e hemicelulose, sendo assim mais fácil o manuseamento das fibras celulósicas assim como também o acesso dos reagentes ao interior da parede da fibra, por outro lado a redução substancial de hemicelulose faz com que hajam alterações estruturais que vão afectar a resistência e a conformabilidade das fibras.

1.3. Introdução à estrutura e mecanismo enzimático

Quimicamente as enzimas são proteínas que possuem a particularidade de aumentar a velocidade das reacções químicas, deste modo classificam-se as enzimas como catalisadores. Comparando a velocidade de uma reacção catalisada por uma enzima e uma reacção não catalisada, a primeira consegue ser 10⁶ a 10¹² vezes superior à segunda [21]. Já comparando a velocidade de uma reacção catalisada por uma enzima com a catalisada por um catalisador inorgânico verifica-se que a primeira é várias ordens de grandeza mais rápida que a segunda [21].

As enzimas actuam através de ligações que estabelecem com substâncias que serão catalisadas e que após esse processo originarão um produto.

De forma muito geral o funcionamento de uma enzima consiste na combinação desta com um determinado substrato, num sítio específico da enzima que é denominado centro activo, de modo a haver um abaixamento da energia de activação da reacção. O centro activo é constituído por resíduos de aminoácidos nos quais as suas cadeias se ligam ao substrato.

Quando se iniciou o estudo das enzimas o método de classificação adoptado foi adicionar o sufixo “ase” ao nome do substrato no qual a enzima ia actuar, como exemplo dessa classificação tem-se as ureases. Contudo esta forma de classificação nem sempre fornecia a informação desejada o que a tornava pouco elucidativa. Por esta razão e também devido à crescente descoberta de novas enzimas a comissão internacional de enzimas criou uma nomenclatura sistemática em que as enzimas são agrupadas em classes (6) (Oxido-Redutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases), subclasses e em algumas outras categorias de acordo com as características da enzima [22]. Por exemplo as endo – 1,4 – β – xilanases ou somente xilanases como também são denominadas são designadas por E.C.3.2.1.8, pertencendo ao grupo das glicosil hidrolases, onde o algarismo 3 identifica a classe (hidrolases), o 2 refere-se à subclasse (glicosilases), o dígito 1 refere-se a enzimas que hidrolisam compostos O – e S – glicosílicos e por fim o número 8 diz respeito ao facto de este tipo de enzima ter uma actividade do tipo endo.

O estudo da cinética enzimática pode ser entendido como uma forma quantitativa de explicar a influência de vários factores sobre a actividade enzimática e a velocidade da reacção. A cinética enzimática é dependente da concentração da enzima e do substrato, da existência ou não de cofactores e inibidores, do pH, da temperatura e também da força iónica [21]. As reacções enzimáticas ocorrem à pressão atmosférica, a temperaturas abaixo dos 100° C e a pH's próximos do neutro, contrariamente ao que acontece na catálise química em que são necessárias temperaturas e pressões elevadas e pH's extremos [21]. As enzimas apresentam como uma das suas principais características a sua elevada especificidade para o substrato e produto o que conseqüentemente leva a que as reacções enzimáticas raramente apresentem produtos secundários [21].

A cinética enzimática em termos gerais, aplica os princípios usados na cinética das reacções químicas sem catalisadores, embora haja um aspecto em que estes dois tipos de cinéticas se afastam. Quando se está na presença de uma enzima a relação entre a velocidade da reacção catalisada e o substrato, apresenta uma forma parabólica, isto é, a velocidade da reacção aumenta com o aumento da concentração de substrato, no entanto este aumento não é uniforme sendo que à medida que a concentração de substrato aumenta o aumento de velocidade é cada vez menor. No limite tem-se que a velocidade da reacção catalisada torna-se aproximadamente constante, ou seja independente da concentração de substrato utilizada, nesse ponto, diz-se que a enzima atingiu a saturação em substrato. Esse

efeito de saturação despertou o interesse de vários cientistas, de entre os quais se destacaram A. J. Brown e V. Henri, estes concluíram que tal efeito era devido ao facto de a enzima e o substrato reagirem reversivelmente para formar um complexo, sendo este, o passo crucial da reacção [23].

Em 1913 L. Michaelis e M. L. Menten desenvolveram uma teoria que se tornou essencial para analisar de forma quantitativa a cinética enzimática. A teoria de Michaelis e Menten postula que a enzima (E) reage num primeiro passo com o substrato (St) para formar o complexo enzima substrato (ES), sendo que seguidamente, ocorre um segundo passo no qual esse complexo se rompe, originando a enzima livre e um produto (P).

1.3.1. Hemicelulases

Genericamente designam-se por hemicelulases as enzimas que hidrolisam as hemiceluloses. A hidrólise das hemiceluloses ocorre aleatoriamente e origina como produtos, oligossacarídeos lineares e ramificados. As hemiceluloses como já foi referido, apresentam uma estrutura bem mais complexa que a celulose, no entanto estas não têm tendência para formar agregados cristalinos como acontece com a celulose, deste modo a acessibilidade da enzima ao substrato é mais eficaz [24]. Sendo as hemiceluloses formadas por vários açúcares, a hidrólise destas moléculas requer a cooperação de diferentes hemicelulases, de acordo com a sua especificidade [24], [25], [26].

O sistema sinérgico de enzimas que actuam nas hemiceluloses é formado por endo e exoxilanasas, mananases, β – xilosidases, α -glucuronidasas e α – arabinofuranosidasas [27]. Especificamente neste estudo não serão aprofundadas as acções de todas as enzimas que actuam nas hemiceluloses, ficando o estudo apenas restrito às enzimas que degradam xilanas e dentro destas apenas se abordará a endo – 1,4 – β – xilanase.

1.3.1.1. Enzimas xilanolíticas: endo – 1,4 – β – xilanase

As xilanas como hemiceluloses que são, possuem uma estrutura complexa o que requer a acção de um conjunto de enzimas aquando da sua hidrólise completa. Na Figura 10 estão representados os sítios de acção na hidrólise das xilanas. Deste modo o sistema enzimático para hidrolisar as xilanas é composto pelas endo β -1,4 xilanasas e β – xilosidases, que

degradam a cadeia principal das xilanas e as α -glucuronidasas, α - L - arabinofuranosidas e as acetilesterases que hidrolisam as cadeias laterais.

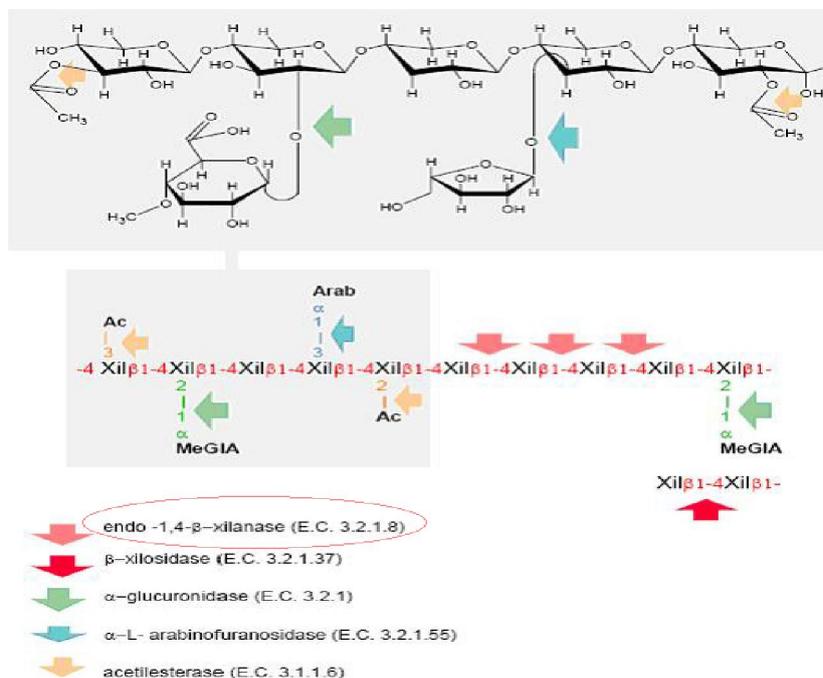


Figura 10: Representação da estrutura da xilana e sítios onde as enzimas actuam adaptado [27]

As endo- β -1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) são endo – enzimas que hidrolisam aleatoriamente ligações glicosídicas do tipo β -1,4 no meio da cadeia da xilana libertando oligossacarídeos.

Embora o nome oficial destas enzimas xilanolíticas seja endo – 1,4 – β – xilanase são também habitualmente denominadas de endoxilanase, 1,4 – β – D – xilanohidrolase, endo – 1,4 – β – D – xilanase, β – 1,4 – xilanase, β – xilanase ou então simplesmente por xilanases [28]. As xilanases são produzidas por vários organismos de entre os quais se destacam fungos, bactérias, algas, protozoários, gastrópodes e artrópodes [29].

As glicosil hidrolases estão distribuídas por seis famílias diferentes sendo elas, as famílias 5 (A), 7, 8 (D), 10 (F), 11 (G) e 43, sendo que as xilanases estão presentes maioritariamente nas famílias 10 e 11 [28]. A classificação anterior tem como critério as propriedades estruturais e a sequência de aminoácidos do domínio catalítico [28].

As xilanases da família 10 são caracterizadas por serem pouco específicas, pois para além das xilanas hidrolisam também celulose, carboximetilcelulose, *p* – nitrofenil – β – glicosídeo, celobiose e laminarina [30]. As enzimas pertencentes a esta família por norma

são mais activas em oligossacarídeos de cadeia curta e apresentam elevado peso molecular (> 30 KDa) e baixo ponto isoeléctrico [28], [31].

As xilanases da família 11 são consideradas as verdadeiras xilanases pois actuam exclusivamente sobre as xilanas [32], [33]. As enzimas pertencentes a esta família são mais activas em xilanas de cadeias longas e geralmente apresentam massas moleculares inferiores a 30 KDa e pontos isoeléctricos elevados [34].

Os dois principais factores que levam ao crescente interesse biotecnológico pela enzima xilanase são a elevada especificidade que esta enzima apresenta para a xilana e também o facto de apresentar uma elevada termoestabilidade, mesmo a temperaturas elevadas (50-100°C) como as que estão patentes nos processos de deslignificação [35]. As enzimas que apresentam propriedades de termoestabilidade mesmo a temperaturas elevadas são denominadas termofílicas.

As endo xilanases mais recorrentes a nível industrial têm origem em bactérias, leveduras ou fungos.

As xilanases de origem bacteriana normalmente são mais activas em meios levemente alcalinos ou neutros ($5 < \text{pH} < 8$) e a temperaturas que estejam na gama dos 50 a 90°C e apresentam pesos moleculares entre 15 a 85 KDa [36], [37]. Quanto às endo xilanases obtidas através de fungos estas apresentam pesos moleculares na gama dos 7 a 60 KDa e têm também maiores níveis de actividade a pH entre 3,5 e 6 e a temperatura no intervalo dos 40 a 60°C [38].

A nível industrial as enzimas produzidas através de fungos são as mais utilizadas, devido, a estas serem sintetizadas de forma extracelular o que facilita a extracção da enzima, uma vez, que torna desnecessário processos de lise celular [39]. Deste modo será essa a origem da xilanase escolhida neste estudo.

1.3.2. Aplicações industriais das enzimas na indústria papelreira

O enorme desenvolvimento dos processos biotecnológicos tem aumentado o interesse pelas enzimas xilanolíticas.

Actualmente a principal aplicação das xilanases é na indústria da pasta e papel nomeadamente, em processos de bibranqueamento. Nestes processos as xilanases surgem como activadoras do branqueamento, pois a sua acção melhora a acessibilidade dos

agentes químicos usados no branqueamento o que acarreta um aumento significativo da branqueabilidade da pasta. Para além do aumento da brancura da pasta também se constata uma diminuição na quantidade dos agentes químicos utilizados no processo isto deve-se ao facto de o acesso dos produtos químicos ser mais eficiente o que faz com que não haja necessidade de cargas tão elevadas de químicos. Este aspecto por si só já é bastante atractivo, embora o seja ainda mais, quando se está a falar de produtos químicos que tem cloro na sua constituição. Segundo alguns autores [40], a incorporação de xilanases nas sequências de branqueamento leva a uma diminuição de 30% na quantidade consumida de compostos químicos com cloro na sua composição o que culmina na diminuição de 15 a 20% na produção de compostos organoclorados. A inclusão de xilanases nas sequências de branqueamento é um método que muitas indústrias do Canadá, Estados Unidos, Suécia e Finlândia já adoptaram [41].

Ainda na área da indústria papelreira é cada vez mais recorrente o uso de enzimas celulíticas na reciclagem de papel, pois estas enzimas alteram as propriedades da superfície da fibra de uma forma que leva a um aumento da afinidade da fibra para com a água [42].

Segundo alguns autores [43], fibras pré-tratadas com celulasas e hemicelulasas levaram a uma diminuição do consumo energético durante a etapa de refinação da pasta sem que os níveis de resistência desta tenham sido afectados.

É também usual o recurso a enzimas para processos de sacarificação de biomassa lenhocelulósica [26].

Os exemplos acima referidos mostraram a contribuição das enzimas do complexo xilanolítico para diversas aplicações industriais.

1.3.3. Hidrólise enzimática vs hidrólise ácida

A hidrólise enzimática possui inúmeras vantagens face à hidrólise ácida. A primeira vantagem que interessa realçar é a inexistência de subprodutos que resultam da hidrólise enzimática [44] o que já não se verifica na hidrólise ácida. Deste modo a viabilidade económica dos processos de hidrólise ácida está sempre associada a tecnologias eficientes de recuperação do ácido, assim como à existência de mercados que tenham interesse em comercializar os seus subprodutos [44].

Outro aspecto a focar é a não necessidade de recorrer a equipamentos de protecção específicos (anticorrosivos) como acontece na hidrólise ácida, pois a hidrólise enzimática pode ser realizada à pressão atmosférica, a temperaturas baixas e em meios pouco ácidos [44].

Apesar das vantagens que a hidrólise enzimática apresenta existem ainda alguns aspectos que tornam pouco atractiva a sua utilização.

Um desses aspectos está relacionado com o custo elevado associado à produção das enzimas que contribui em grande escala para aumentar o custo do processo produtivo, no entanto, este custo pode ser mitigado adoptando métodos de reciclagem das enzimas [44].

A reduzida velocidade da reacção da hidrólise enzimática quando comparada com a hidrólise ácida é outro item que conduz à pouca aderência por este tipo de hidrólise a nível industrial. Por fim mas não menos importante outro motivo que leva a abdicar da hidrólise enzimática face à hidrólise ácida é o facto de no caso de hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos ser necessário uma etapa de pré-tratamento a que o material é submetido de forma a melhorar a acessibilidade da enzima no substrato [44].

1.3.4. Aspectos a ter em conta na hidrólise enzimática de pastas celulósicas

O principal problema no tratamento enzimático de pastas celulósicas está relacionado com a complexidade da interacção enzima/substrato, pois a acção da enzima varia em função da composição inicial de substrato, por exemplo a variação da acessibilidade de um substrato para outro influencia a acção da enzima [45]. Deste modo os aspectos da fibra como a sua natureza, o grau de organização molecular dos seus constituintes, o teor de lenhina e o estado da sua superfície são pontos a ter em conta aquando da hidrólise enzimática [45].

Para além das propriedades do substrato também as condições em que ocorre o tratamento enzimático são fulcrais. De entre os aspectos que interessa realçar estão a consistência da pasta, que deve ser elevada para favorecer a adsorção enzimática, a agitação, que deve ser moderada, o tempo de reacção que não deve ser muito longo para evitar a perda de actividade da enzima, a temperatura que deve ser a adequada à actividade da enzima para evitar a sua desnaturação e o pH que deve ser o adequado para não

provocar alterações conformacionais na fibra e deste modo alterar a sua acessibilidade [45].

1.3.5. Pré-tratamentos que auxiliam a hidrólise enzimática

Para que a hidrólise enzimática das xilanas seja eficiente é necessário que as enzimas consigam aceder-lhes. No entanto a parede celular é impermeável a moléculas de grande dimensão como pode ser o caso de algumas enzimas. Para superar esta barreira são usuais a adopção de pré-tratamentos tanto químicos como físicos. Os pré-tratamentos químicos consistem em ácidos e bases que são utilizados para solubilizar a hemicelulose e/ou lenhina e assim aumentar a porosidade da matriz fibrosa [46], [47].

A opção por métodos físicos como é o caso da moagem acarreta uma diminuição da granulometria do material de partida, um aumento da área superficial de contacto e uma diminuição da cristalinidade da celulose, no entanto, este método tem associado a si elevados consumos energéticos [48].

Idealmente o pré-tratamento deveria maximizar a digestibilidade da enzima, minimizar a perda de açúcares, não requerer reagentes que possam inibir a actividade da enzima, minimizar o uso de energia, reagentes e equipamentos e por fim ser possível a sua transposição para a escala industrial [49].

Uma possibilidade de aumentar a acessibilidade da enzima ao substrato numa pasta celulósica, é o tratamento prévio da pasta por alta pressão. Seguidamente será apresentada uma breve introdução a essa tecnologia assim como o impacto que esta tem sobre o material celulósico quando este é sujeito a esse tratamento.

1.4. Processamento por alta pressão hidrostática (HHP)

A cada vez maior exigência, requerida por parte dos consumidores, principalmente na área alimentar, despontou o surgimento de novas tecnologias. Uma dessas tecnologias que emergiram foi o processamento por alta pressão hidrostática ou isostática (HPP) [50].

O HPP na indústria alimentar é cada vez mais utilizado pois esta técnica possui características que permite submeter o alimento ao “sistema” sem alterar as suas

qualidades e atributos originais factos, que não se verificavam com as técnicas anteriormente usadas como o processamento térmico. Este tipo de processamento pode ser executado em combinação com a temperatura desejada, possibilitando o seu uso em alimentos termodegradáveis. Embora esta técnica seja mais recorrente na indústria alimentar a sua utilização não é restrita a esta, como se irá ver no decorrer deste trabalho.

A submissão de pasta celulósica de *Eucalyptus globulus* produzida pelo processo de kraft ao método de HPP permitirá a penetração em profundidade da água no interior das fibras (como foi demonstrado num trabalho anterior supervisionado pelos orientadores deste trabalho), aumentando o nível de hidratação destas e para além disso facultará o afastamento das fibras celulósicas o que futuramente será vantajoso para a hidrólise enzimática, pois facilitará o acesso da enzima a locais mais internos da fibra [51].

1.4.1. O sistema de alta pressão

No que se refere à constituição do equipamento de alta pressão, este é formado por quatro sistemas principais: vaso de alta pressão, sistema gerador de pressão, dispositivo para controlo da temperatura e sistema operacional.

Após a colocação do material em estudo no interior do vaso este é fechado e dá-se procedimento à introdução do meio transmissor de pressão (água). Posto isto, o vaso é pressurizado através de uma bomba de baixa pressão, que conjuntamente com o sistema de desarejamento eliminam o ar do vaso de alta pressão. Estando já o vaso livre de ar é então aplicada a alta pressão.

A aplicação de alta pressão pode ser feita por três métodos: compressão directa, compressão indirecta e por aquecimento do meio de pressão [50].

A geração de alta pressão pelo método directo, em traços muito gerais, consiste na criação de pressão, gerada por uma bomba de baixa pressão na extremidade de um pistão que se encontra mergulhado no interior do vaso de alta pressão. Esta técnica é caracterizada pela compressão rápida que gera, embora tenha em seu contra a deficiente selagem, o que conjuntamente com aspectos mecânicos associados ao próprio sistema confinam a sua utilização à escala laboratorial [52].

O método de compressão indirecta consiste no bombeamento do meio transmissor de pressão através de um sistema de tubos até ao vaso de alta pressão, este movimento é

executado com o auxílio de um amplificador de alta pressão [50]. Este método é actualmente o mais recorrente a nível industrial, sendo também o adoptado para este estudo.

O terceiro e último método gerador de alta pressão é o aquecimento do meio de pressão, este consiste numa acção conjunta entre temperatura e pressão, uma vez que este método tem por base a expansão do meio transmissor de pressão devido ao aumento da temperatura o que consequentemente leva a um aumento de pressão.

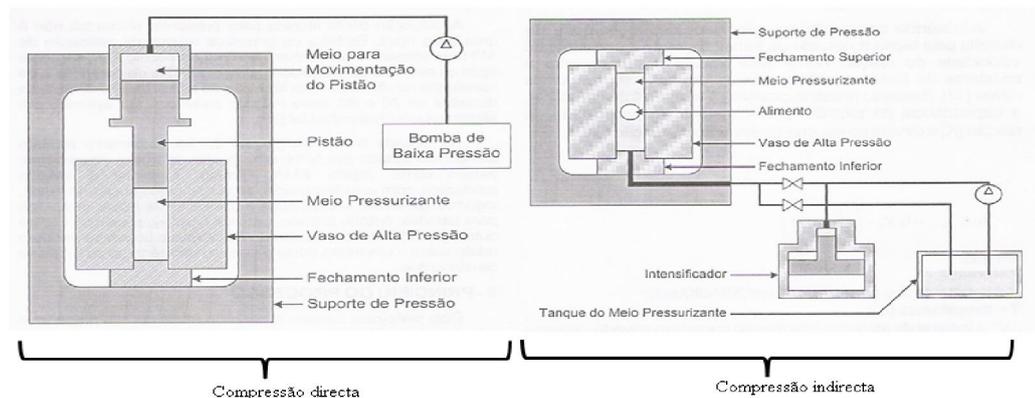


Figura 11: Esquema de um sistema de alta pressão hidrostática (HPP) por compressão directa (esquerda) e indirecta (direita) adaptado [53]

1.4.2. Princípios do método de alta pressão hidrostática (HHP)

A técnica de HPP assenta em dois princípios chave: Princípio de Le Chatelier e o Princípio isostático.

O Princípio de Le Chatelier postula que um sistema em equilíbrio responde a qualquer perturbação, com uma alteração que tende a contrariar a perturbação a que foi sujeito. Deste modo, os processos associados a uma diminuição de volume são favorecidos a pressões elevadas e inibidos a pressões reduzidas [54].

O segundo princípio inerente ao método de HPP é o Princípio isostático. Este princípio indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através de uma amostra em estudo.

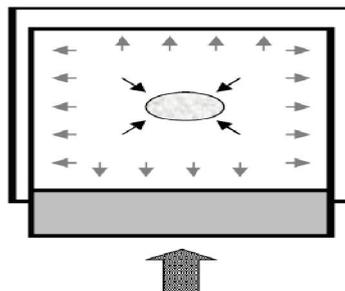


Figura 12: Representação esquemática do Princípio isostático ^[50]

1.4.3. Impacto do processamento por alta pressão hidrostática na fibra celulósica

O principal intuito deste trabalho é verificar o efeito na hidrólise enzimática quando previamente o substrato lenhocelulósico é sujeito ao pré-tratamento de alta pressão hidrostática (HHP).

A alta pressão hidrostática faz com que a distância entre as fibras celulósicas aumente o que possibilita a penetração da enzima em maior profundidade na fibra.

A submissão do material lenhocelulósico à alta pressão pode também acarretar benefícios na etapa de refinação de pastas, fazendo com que estas tenham uma menor tendência para a hornificação.

O fenómeno de hornificação é definido como um conjunto de processos físico-químicos decorrentes da eliminação de água no processo de secagem, da diminuição do índice de retenção de água (WRV) e do aglomerado de fibras que se unem em forma de hélice e que contribuem para a drástica e irreversível diminuição das propriedades mecânicas das fibras celulósicas [55].

O favorecimento da ocorrência de fenómenos de hornificação, após, a secagem de pastas celulósicas está intimamente correlacionada com alterações supramoleculares na celulose.

A nível estrutural as fibrilas elementares não são elementos de tamanho e forma uniforme. Quando ocorre o processo de secagem assiste-se à saída de água e eliminação de parte das hemiceluloses que se encontravam em redor da fibrila. Caso este acontecimento coincida com a existência de fibrilas elementares vizinhas com tamanho e forma semelhantes, estas tem tendência para se agrupar, formando um cocristalito de celulose, a este processo designa-se cocristalização e encontra-se esquematizado na Figura 13 [56].

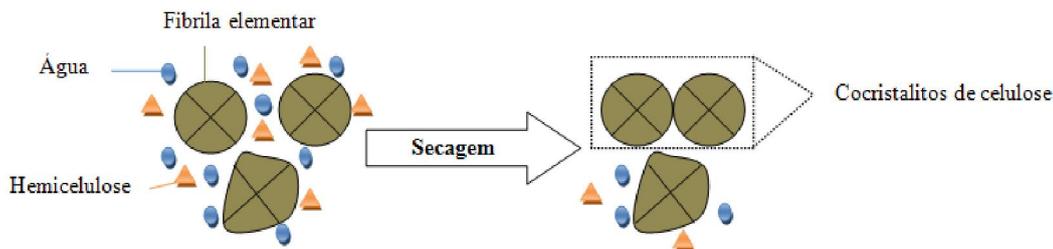


Figura 13: Representação esquemática do processo de cocristalização

Outra transformação supramolecular que acontece nas fibrilas de celulose é o fenômeno de recristalização, este consiste no rearranjo da celulose paracristalina em celulose cristalina, aumentando deste modo o grau de cristalinidade (GC) da celulose [9].

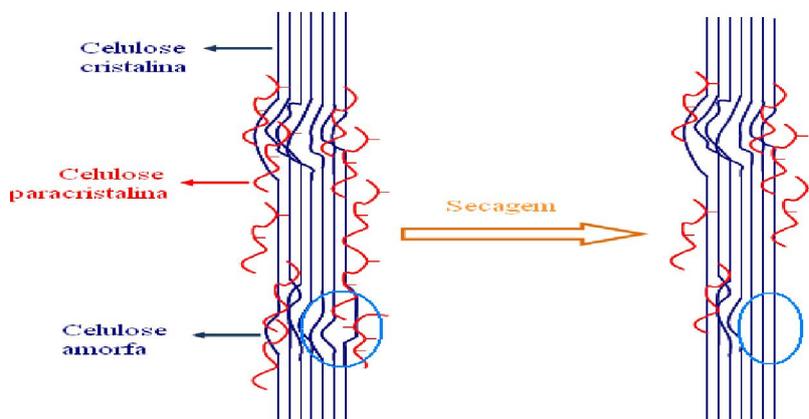


Figura 14: Representação esquemática do processo de recristalização da celulose adaptado [9]

Como já foi referido, as hemiceluloses têm enorme tendência para estabelecer ligações com as moléculas de água, mas aquando do processo de cozimento as moléculas de água abandonam a fibra havendo a quebra das ligações hemicelulose-água e sendo a lenhina também quase na totalidade removida, deixando a fibra sem a sua “camada protectora”, tanto no que diz respeito à lenhina como à interacção hemicelulose-água.

Uma solução adoptada para minimizar o “desamparo” a que as fibras estão sujeitas, é a re-hidratação/ refinação da fibra, que embora aumente o nível de hidratação desta, não consegue atingir o nível de hidratação inicial (antes da secagem).

É nesta etapa que entra a contribuição do efeito de alta pressão, pois este método permite a “abertura de caminhos” para as moléculas de água possibilitando a seu acesso às zonas interfibrilares/intermicrofibrilares que antes estavam inacessíveis. A alta pressão possibilita a penetração forçada da água em zonas mais profundas das microfibrilas e este

facto faz com que as fibras que são submetidas a este tratamento quando forem submetidas ao processo de secagem, sofrerão de uma remoção de água superficial tal como acontecia numa fibra que não tivesse sido submetida ao tratamento de HHP. A diferença agora, é que para além da água superficial existe também água impregnada no interior das microfibrilas e essa água por se encontrar “entalada” entre as fibrilas devido a estas se terem aproximado após a remoção da água superficial impossibilita a saída da água infiltrada entre as fibrilas [51]. Este facto acarreta consequências no que diz respeito às propriedades mecânicas das fibras, pois com este procedimento é possível manter a hidratação da fibra garantindo o intumescimento desta o que consequentemente fornece à fibra propriedades de elasticidade e flexibilidade e evita a dureza e quebra da fibra devido ao efeito de hornificação [51].

Capítulo II Material e Métodos

O capítulo II contempla a caracterização e composição química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*, o desenvolvimento de um método de execução de hidrólise enzimática com xilanase recorrendo numa fase inicial a um substrato artificial (xilano) e posteriormente à pasta kraft sendo, os açúcares redutores quantificados pelo método DNS. Seguidamente é estudado o efeito que a alta pressão exerce na acessibilidade/hidrolisabilidade da pasta celulósica. Numa fase posterior realizou-se uma primeira hidrólise com xilanase seguida de uma hidrólise posterior com celulase e quantificou-se através do método de DNS os açúcares redutores e por cromatografia gasosa os açúcares neutros. Por fim foram observadas ao microscópio suspensões de pasta kraft sem e com pré-tratamento de alta pressão e dos seus respectivos hidrolisados.

2. A pasta de *Eucalyptus globulus*

A pasta de *Eucalyptus globulus* usada na execução experimental deste trabalho foi retirada da máquina de tiragem, da fábrica do grupo Portucel Soporcel localizada em Cacia. A referida pasta foi produzida pelo processo kraft e branqueada segundo a sequência DE_pDD (um primeiro estágio de dióxido, seguido de uma extracção alcalina com peróxido e por fim mais dois estágios de dióxido) e apresenta uma brancura de 90% ISO.

A pasta fornecida foi cortada em pequenos pedaços e levada a intumescer em água destilada, sendo posteriormente desintegrada e filtrada sob vácuo. A pasta já filtrada foi colocada em tabuleiros e deixada a secar ao ar durante três dias.

2.1. Análise química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

2.1.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* foi determinado com recurso ao método gravimétrico. Este método assenta no registo da perda de massa da amostra antes e após a secagem. Começou-se por pesar cerca de $1 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ de pasta e levá-la à estufa (Heraeus Modelo UT6) a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, sendo que depois desse

período foi deixada a arrefecer, no excicador, durante 10 minutos. Após esse tempo a amostra foi pesada e voltou novamente à estufa onde permaneceu 4 horas à mesma temperatura.

Deixou-se a amostra a arrefecer no excicador e pesou-se. O teor de humidade (W) foi determinado através da equação 1.

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

2.1.2. Determinação do teor de extractáveis em acetona

A determinação do teor de extractáveis foi realizada de acordo com a Norma Tappi T 204 om-88. Pesou-se $6 \text{ g} \pm 0,001\text{g}$ de pasta, num soxhlet de 50 mL e adicionou-se 200 mL de acetona. Efectuou-se a extracção durante 4h. Seguidamente o solvente foi evaporado num evaporador rotativo e os extractos secaram na estufa, até peso constante, a $105 \pm 3^\circ\text{C}$

O teor de extractáveis (E_x) foi determinado segundo a equação 2.

$$E_x(\%) = \left(\frac{m_{\text{extractáveis}}}{m_{\text{amostra}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

2.1.3. Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado através da calcinação de $1 \text{ g} \pm 0,001\text{g}$ de pasta à temperatura de 525°C durante três horas, segundo a Norma Tappi T 211 om-93. A percentagem de cinzas (Z) foi determinada através da equação 3.

$$Z(\%) = \left(\frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

2.1.4. Determinação do teor de açúcares neutros

A determinação dos açúcares neutros está assente na hidrólise em meio ácido de polissacarídeos.

A hidrólise dos polissacarídeos foi efectuada, partindo de 10 mg de pasta com 400 μL de H_2SO_4 a 72%. Seguidamente o preparado foi a incubar durante 3 horas e à temperatura ambiente (25°C) num digestor (Clifton Modelo BH-1/DIG). Após término o tempo de incubação foram adicionados 4,4 mL de água destilada e voltou-se a incubar o preparado durante 2 horas e 30 minutos à temperatura de 100°C .

Posteriormente procedeu-se à redução dos açúcares. Para tal, arrefeceu-se o hidrolisado e adicionou-se 200 μL de 2 – desoxiglucose como padrão interno. A cerca de 1 mL do hidrolisado, adicionou-se, em gelo, 0,2 mL de NH_3 a 25%. À solução anterior, adicionou-se 0,1 mL de NH_3 (3M) contendo 150 mg/mL de NaBH_4 , para reduzir os monossacarídeos a alditóis e incubou-se a mistura durante 1 hora a 30°C .

Após a redução dos açúcares, procedeu-se à eliminação do NaBH_4 através da adição de 50 μL (duas adições) de ácido acético glacial e arrefeceu-se em gelo.

A 0,3 mL da solução anterior adicionou-se 0,45 mL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético e incubou-se a mistura durante 30 minutos a 30°C .

A destruição do anidrido acético e a extracção dos acetatos de alditol das amostras foi efectuada por adição de 3,75 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Posteriormente a solução foi agitada e centrifugada (2000 rpm, 30 segundos), procedendo-se à aspiração da camada superior (aquosa) e adicionou-se 3 mL de água destilada e 2mL de diclorometano. Seguidamente a solução foi agitada e centrifugada e novamente removida a camada aquosa. Adicionou-se 3mL de água destilada e repetiu-se o procedimento de agitação, centrifugação e aspiração da camada aquosa. Repetir o procedimento anterior mais duas vezes. Procedeu-se à evaporação do diclorometano sob atmosfera de azoto.

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

A quantificação dos acetatos de alditol foi feita num cromatógrafo de gás Varian 3350 com a injeção de 2 μL de amostra. Para a quantificação utilizaram-se rectas de calibração elaboradas previamente. As condições cromatográficas foram as seguintes:

- ♦ Temperatura do injecto 220 $^\circ\text{C}$;
- ♦ Temperatura inicial da coluna 220 $^\circ\text{C}$ (5 minutos);
- ♦ Gradiente de temperatura 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$;

- ♦ Temperatura final da coluna 230°C (6 minutos);
- ♦ Temperatura do detector 230°C.

2.2. Hidrólise enzimática

A montagem experimental do equipamento utilizado para a hidrólise enzimática, encontra-se esquematizado na Figura 15. Inicialmente procedeu-se à hidrólise enzimática da solução de xilano a 1% (p/V) com o objectivo de otimizar as condições de hidrólise.

Após esse estudo efectuou-se novamente a hidrólise, mas agora tendo como substrato uma solução de pasta kraft de *Eucalyptus globulus*. Após esta etapa fez-se nova hidrólise enzimática do substrato pasta kraft de *Eucalyptus globulus* só que esta agora foi previamente processada em alta pressão. O tratamento de alta pressão ocorreu a diferentes pressões e tempos de processamento de forma a apurar quais as condições mais vantajosas de operação.

2.2.1. Características da enzima utilizada

A xilanase utilizada na reacção de hidrólise é da marca Fluka Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) e tem o nome comercial de Pentopan Mono BG (nº de código comercial X2753). Esta xilanase é obtida do fungo *Thermomyces lanuginosus* e foi produzida por fermentação submersa. A xilanase de *Thermomyces lanuginosus* apresenta uma actividade de 2500 FXU (W)/g. FXU (W) definido como unidades fúngicas de xilanase em trigo. A gama de pH recomendada para a actuação desta enzima situa-se entre 4 e 6 e a temperatura deve ser inferior a 75°C.

2.2.2. Hidrólise enzimática do xilano

2.2.2.1. A solução de xilano 1% (p/V) como substrato

Pesou-se 1 g \pm 0,001g de xilano de bétula (nº de código comercial X0502) da marca Fluka Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) e adicionou-se 80 ml da solução tampão de acetato de sódio (0,05 M e pH=5). A mistura foi levada à ebulição num banho

termostatizado e seguidamente foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente sob agitação. Seguidamente centrifugou-se a solução a 5000 rpm durante 15 min e decantou-se.

Procedeu-se a nova centrifugação e decantação nas mesmas condições que a executada anteriormente. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 ml e perpez-se o volume com a solução tampão de acetato de sódio. Homogeneizou-se e guardou-se no frio a 4°C.

2.2.2.2. Determinação da actividade enzimática da xilanase em xilano

A determinação da actividade enzimática da xilanase foi feita pela quantificação de açúcares redutores totais libertados a partir da xilana, de acordo com o método descrito em [57] e a pH 5. Os açúcares redutores foram medidos pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) descrito por [58] usando a glucose como padrão.

Primeiramente colocou-se 15 ml da solução de xilano 1% (p/V) a aquecer num banho termostatizado a 40°C. Após a solução se encontrar à temperatura desejada (40°C) foi transferida para um reactor (também a 40°C) e adicionou-se 0,5 mL de enzima convenientemente diluída. A mistura reaccional permaneceu sob agitação constante (2000 rpm). À medida que a reacção ocorria foram retiradas alíquotas de 0,5 mL a tempos pré-determinados, sendo que sempre que necessário a amostra era diluída em tampão acetato de sódio (0,05M e pH 5) de modo a se encontrar na gama de valores da recta de calibração.

A reacção foi terminada pela adição de 1 mL de DNS, sendo a solução seguidamente agitada no vórtex Velp Scientifica. Depois de agitada foi colocada durante 5 minutos a um banho termostatizado a 100°C sendo que após esse tempo foi deixada a arrefecer em banho de água à temperatura ambiente.

Seguidamente adicionou-se 10 mL de água destilada, agitou-se convenientemente a mistura e leu-se a absorvância num espectrofotómetro do visível Shimadzu UV mini-1240 a 540 nm. Foi também preparado um ensaio branco para ajuste do zero do espectrofotómetro.

Nesse ensaio o volume de enzima foi substituído pela solução tampão de acetato de sódio, (0,05 M e pH 5) sendo o restante procedimento análogo ao descrito anteriormente.

O valor de absorvância lido no ensaio do branco foi subtraído ao das restantes amostras.

A curva padrão foi construída com soluções de glucose com a gama de concentrações a variar entre 0 e 0,8 mg/mL.

Foi definida uma unidade enzimática (1U) como a quantidade de enzima que liberta 1 μ mol de açúcares redutores por minuto, expresso em glucose.

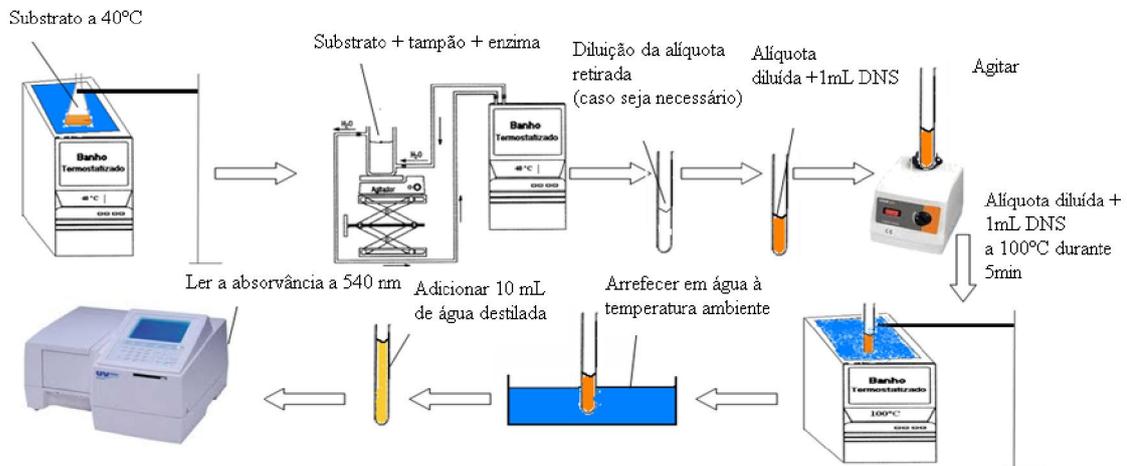


Figura 15: Representação esquemática do procedimento adoptado para determinar a actividade da xilanase

2.2.3. Hidrólise enzimática da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

2.2.3.1. A pasta kraft de *Eucalyptus globulus* como substrato

Pesou-se 0,25 g \pm 0,001g de pasta kraft de *Eucalyptus globulus* seca e deixou-se a intumescer em tampão acetato de sódio (0,05 M e pH 5) sob agitação durante 24h.

Seguidamente triturou-se a solução intumescida e procedeu-se à filtração da mesma sob vácuo. Por fim registou-se a massa de pasta filtrada.

2.2.3.2. Determinação da actividade enzimática da xilanase em pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

Primeiramente colocou-se 10 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M e pH 5) num reactor a 40°C. Após o tampão se encontrar à temperatura desejada foi-lhe adicionada 0,5g \pm 0,001g de pasta previamente intumescida e filtrada e 0,25 mL de enzima convenientemente diluída.

Seguidamente foram retiradas alíquotas de 0,1 mL da mistura reaccional a tempos previamente estabelecidos. O restante procedimento da hidrólise enzimática é análogo ao descrito anteriormente para a hidrólise enzimática de xilano.

2.2.4. Hidrólise enzimática de pastas kraft de *Eucalyptus globulus* processada em alta pressão hidrostática (HHP)

2.2.4.1. Características e modo de operação do aparelho de alta pressão e preparação das amostras

O processamento da pasta kraft em alta pressão, foram executados no aparelho High Pressure U33, fabricado pelo Institute of High Pressure Physics na Polónia e ilustrado na Figura 16.



Figura 16: Unidade principal do aparelho High Pressure U33

Sumariamente a constituição do aparelho consiste numa unidade móvel principal e de um termóstato de circulação comercial, sendo que todos os elementos de alta pressão se encontram na retaguarda do aparelho.

As amostras são colocadas em frascos de plástico que apresentam uma capacidade de 35 mL e estes por sua vez, são colocados dentro de sacos de plástico posteriormente selados de modo a proteger a amostra do líquido transmissor de pressão que se encontra no vaso.

Seguidamente na Tabela 3 são apresentadas as características do aparelho de alta pressão utilizado neste estudo.

Tabela 3: Características principais do aparelho High Pressure U33

Gama de pressões permitidas	0 - 700 MPa
Gama de temperaturas permitidas	-20 – 100 °C
Volume do vaso	100 mL
Diâmetro do vaso	35 mm
Dimensões máximas dos invólucros selados	0,34 x 98 mm (90 mL)
Líquido de pressurização	Propilenoglicol : Água (60:40)

Preparação das amostras

Pesou-se 3 g \pm 0,001g de pasta de *Eucalyptus globulus* e deixou-se a intumescer em 105 mL de tampão acetato de sódio, (0,05 M e pH 5) durante 24 h e sob agitação constante. Posteriormente a pasta foi triturada e filtrada em vácuo. Para cada pressão, foram realizados dois ensaios com tempos de processamento diferentes e ainda um ensaio que serve de controlo em que a pasta não é submetida à alta pressão. Deste modo a pasta após filtrada é distribuída uniformemente por três frascos de plástico sendo estes preenchidos com tampão. Os frascos são colocados dentro de embalagens flexíveis, selados e submetidos à pressão.

Seguidamente na Tabela 4 são fornecidas as pressões e os tempos de processamento realizados nas pastas utilizadas neste estudo.

Tabela 4: Gama de pressões e tempos de processamento a que foram submetidas as amostras

Pressão (MPa)	200	300	400
Tempo (min)	45	15	15
		45	45

2.2.4.2. Determinação da actividade enzimática de xilanase em pasta kraft de *Eucalyptus globulus* pré-tratada em alta pressão

Após o processamento de alta pressão a pasta foi novamente filtrada a vácuo e pesada.

Seguidamente pesou-se cerca de 0,5 g \pm 0,001g da pasta anteriormente filtrada e colocou-se no reactor a 40°C que já continha 10 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M e

pH 5). Após o tampão e a pasta se encontrarem à temperatura desejada (40°C) adicionou-se a estes 0,25 mL de enzima. O restante procedimento é análogo ao descrito para a hidrólise enzimática de pasta kraft, sem processamento de alta pressão.

2.2.5. Sistema sinérgico entre a xilanase e a celulase na hidrólise de xilanas de pasta kraft pré-tratada a alta pressão

2.2.5.1. Características das enzimas utilizadas no sistema combinatório de hidrólise

Nesta etapa efectuou-se primeiramente uma hidrólise com uma xilanase que apresenta as características referenciadas em 2.2.1.

Após o tratamento com xilanase a pasta foi hidrolisada pela celulase da marca Fluka Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), comercialmente denominada por 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucano 4-glucano- hidrolase (nº de código comercial C9422). Esta celulase é uma *endo* enzima produzida pelo fungo *Trichoderma virido* e apresenta uma actividade enzimática de 9 U/mg sendo a sua temperatura e óptimo 37°C e o seu pH óptimo 5.

2.2.5.2. Acção conjunta das enzimas xilanase e celulase na hidrólise da pasta kraft pré-tratada em alta pressão

Realizou-se nova reacção de hidrólise enzimática da pasta kraft, sendo que esta foi previamente processada a 400 MPa durante 15 minutos. É de realçar que todo o procedimento é similar ao descrito anteriormente no tópico 2.2.4.2. Após a hidrólise enzimática com xilanase a pasta contida no reactor foi lavada convenientemente com água destilada e filtrada sob vácuo.

Posteriormente pesou-se 0,16 g \pm 0,001g da pasta que tinha sido anteriormente filtrada e colocou-se no reactor conjuntamente com 6,8 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M e pH 5), sendo que todo o sistema reaccional já se encontrava a 40°C. O passo seguinte consistiu na adição de 1,2 mL de enzima celulase. Posto isto foram retiradas alíquotas de 0,1 mL em tempos pré-estabelecidos durante 1 h de reacção enzimática. As alíquotas retiradas foram sujeitas à quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS tal como foi já descrito no tópico 2.2.2.2.

2.3. Determinação do teor de açúcares neutros nas pastas kraft processadas a alta pressão após a hidrólise enzimática

Após a reacção de hidrólise enzimática os hidrolisados foram filtrados a vácuo, lavados com água destilada e colocados a secar ao ar. Depois dos hidrolisados estarem convenientemente secos foram determinados os açúcares neutros de forma análoga à descrita no subcapítulo 2.1.4.

Capítulo III Análise e Discussão de Resultados

No presente capítulo apresentam-se os resultados obtidos neste trabalho, assim como a discussão dos mesmos. Podem ainda ser consultados em Anexos as tabelas, gráficos e cálculos auxiliares, que complementam a compreensão dos dados apresentados.

3.1. Composição química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

Como o objectivo principal da hidrólise enzimática é degradar as xilanas na pasta kraft *Eucalyptus globulus* é essencial conhecer com rigor a composição química da matéria-prima utilizada, Tabela 5.

Tabela 5: Composição química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

Composição	Teor_{experimental} (%)	Dados da literatura (%) ^[59]
Cinzas	0,12	0,10-0,30
Extractáveis*	0,18	0,15-0,23
Lenhina residual	0,20	0,10-0,30
Monossacarídeos neutros		
Arabinose	0,3	---
Xilose	15,8	14,0-18,0
Manose	0,4	0,2-0,3
Galactose	0,2	0,2-0,5
Ramnose	0,2	0,2-0,4
Fucose	0,2	---
Glucose	83,0	80,8-85,4

*Extractáveis em acetona

Conforme se pode verificar pela análise da tabela, os valores obtidos encontram-se dentro dos valores limite reportados na literatura [59]. Importa realçar que o teor de lenhina residual apresentado não foi experimentalmente determinado neste trabalho, no entanto o seu valor foi já anteriormente calculado em trabalhos que contaram com a colaboração de um dos orientadores desta tese [60] e onde se obteve o valor de 0,2%.

3.2. Hidrólise enzimática do xilano

Com o intuito de montar o método para a determinação da actividade enzimática da xilanase utilizou-se como substrato o xilano de bétula. A escolha do xilano como substrato está relacionada com a semelhança estrutural existente entre este e as xilanas presentes na pasta kraft de *Eucalyptus globulus*. Com este ensaio é assim possível encontrar quais as condições experimentais a serem usadas posteriormente na hidrólise da pasta kraft.

Como primeira tentativa, realizou-se a hidrólise do xilano segundo as condições experimentais apresentadas na Tabela 6. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 17, onde é possível acompanhar a quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo de reacção.

Tabela 6: Condições em que foi realizado o primeiro ensaio de hidrólise enzimática do xilano

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	3000
V (substrato no reactor) (mL)	30
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,5
NOTA: As alíquotas retiradas ao longo do tempo foram diluídas 3,5 vezes em tampão	

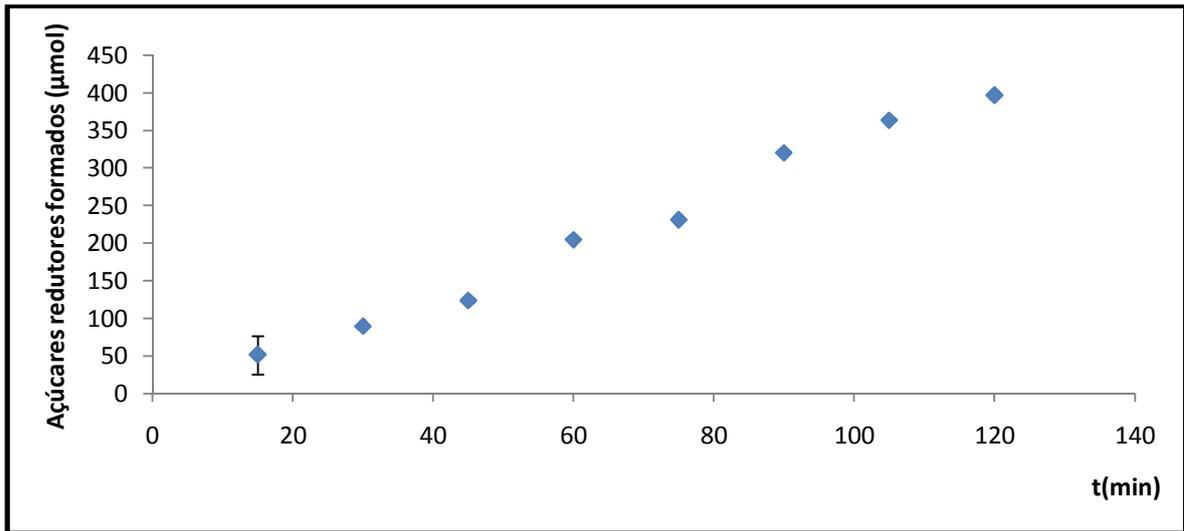


Figura 17: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o primeiro ensaio de hidrólise enzimática do xilano

Por análise Figura 17, observa-se que a quantidade de açúcares redutores formados aumenta ao longo do tempo, verificando-se que decorridos 120 minutos após o início da reacção, a xilanase ainda não conseguiu degradar todo o xilano possível. Esta afirmação tem em conta o facto de nesse instante ainda não se ter alcançado um patamar na formação de açúcares redutores, revelador de que a quantidade máxima de produto foi alcançado e que, a partir desse instante não é possível a degradação de mais xilano. Desta forma procedeu-se a um segundo ensaio perante novas condições experimentais, Tabela 7 na tentativa de alcançar a zona do patamar.

Tabela 7: Condições em que foi realizado o segundo ensaio de hidrólise enzimática do xilano

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
V (substrato no reactor) (mL)	15
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,5
NOTA: As alíquotas retiradas ao longo do tempo foram diluídas 9 vezes em tampão	

Os resultados obtidos neste novo ensaio encontram-se apresentados na Figura 18, através da qual é observável a existência de uma notória fase de crescimento até aos 75 minutos e o alcance do patamar aos 110 minutos, com uma produção máxima de açúcares redutores de 165,2 μmol.

Com as novas condições experimentais, onde se diminuiu para metade o volume de substrato a usar, foi então alcançada a quantidade máxima de açúcares redutores formados, sendo que a partir dos 110 minutos de reacção não foi possível degradar mais xilano.

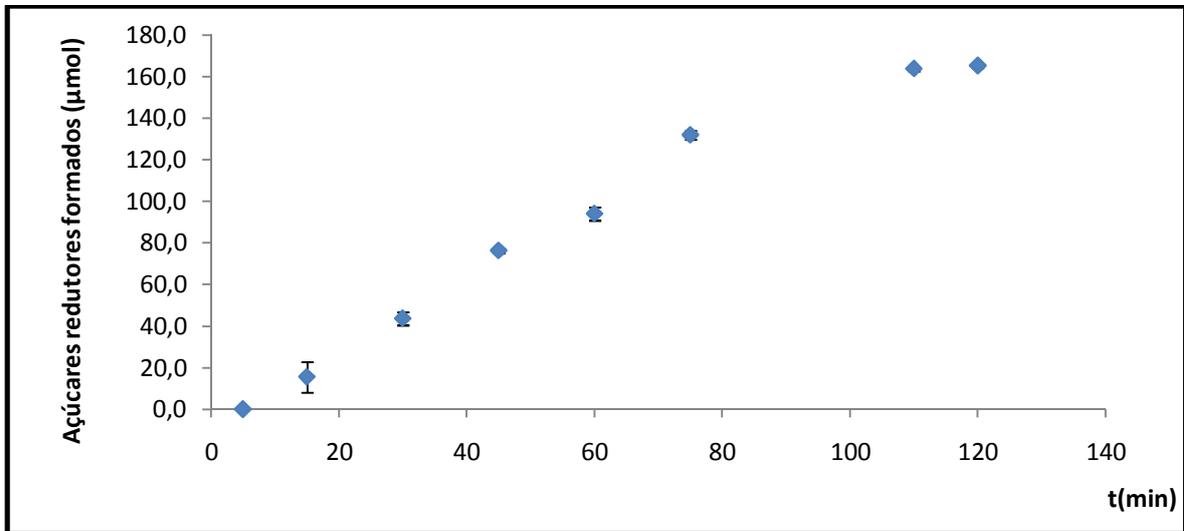


Figura 18: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o segundo ensaio de hidrólise enzimática do xilano

3.3. Hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

Apuradas as condições experimentais mais favoráveis à hidrólise do xilano, estas foram utilizadas na hidrólise da pasta kraft. A hidrólise enzimática foi realizada com 1,323 g de pasta kraft nas condições referidas na Tabela 8, encontrando-se os resultados obtidos apresentados na Figura 19.

Tabela 8: Condições em que foi realizado o primeiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	1,323
V (tampão no reactor) (mL)	15
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,5
NOTA: As alíquotas retiradas ao longo do tempo foram diluídas 5 vezes em tampão	

Analisando a Figura 19 observa-se que após 120 minutos de reacção ainda não é possível afirmar-se que o patamar foi atingido. Este comportamento já era expectável uma vez que a enzima tem uma maior dificuldade em aceder às xilanas presentes na pasta, visto estas se encontrarem associadas a outros componentes celulósicos e não celulósicos.

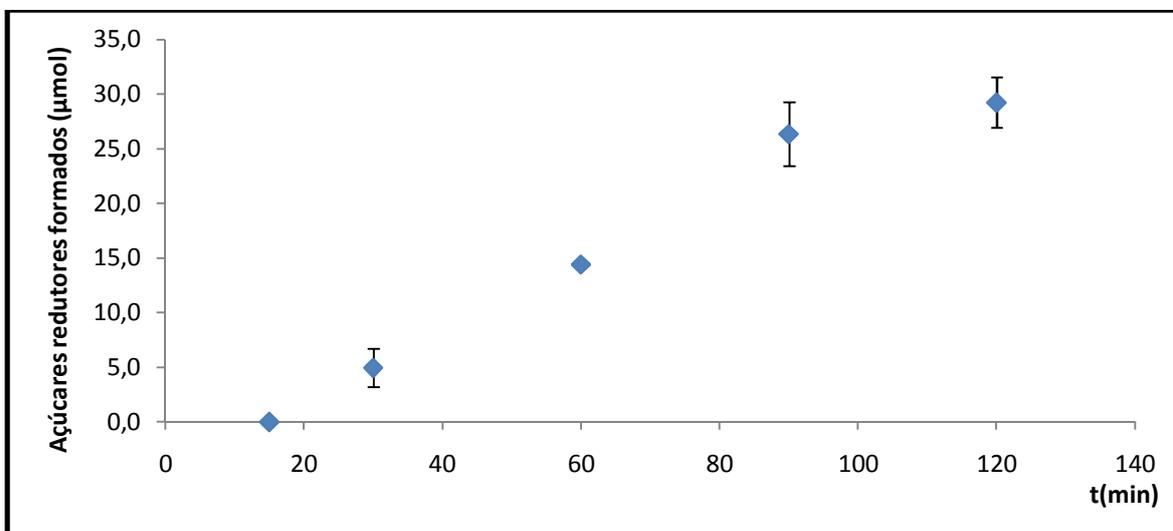


Figura 19: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o primeiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

Efectuou-se um segundo ensaio em que por meras questões operatórias, se optou por diminuir a massa de substrato e os volumes de tampão e enzima, mantendo inalterada a concentração da solução enzimática (0,8 mg/mL). As condições experimentais inerentes a estas alterações encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Condições em que foi realizado o segundo ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	0,721
V (tampão no reactor) (mL)	10
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,25

Como resultado destas alterações assiste-se a uma diminuição muito significativa da quantidade de produto formado (Figura 20) face ao primeiro ensaio efectuado com pasta (Figura 19), não se conseguindo uma vez mais atingir o patamar no intervalo de tempo testado.

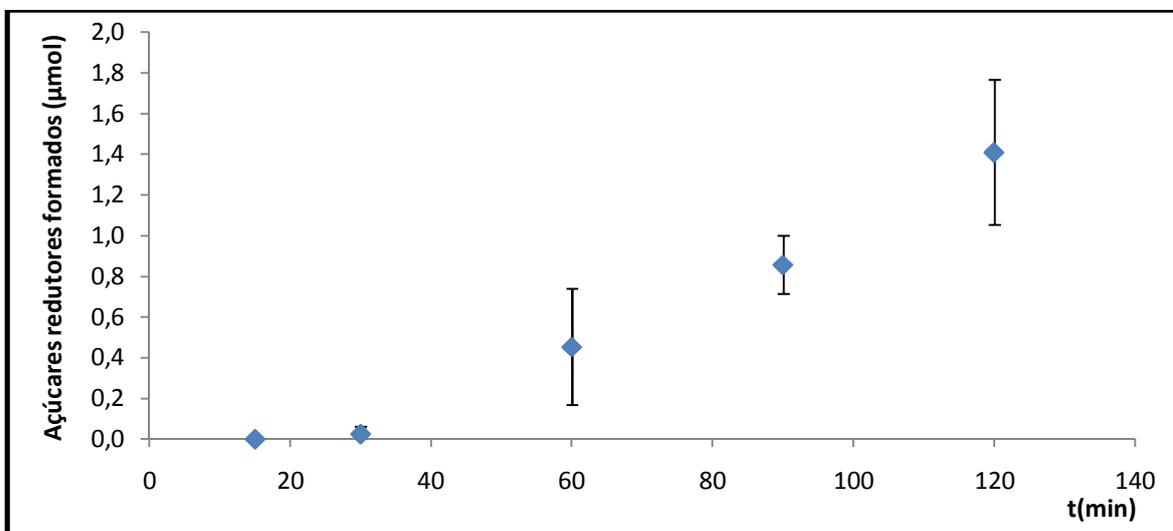


Figura 20: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o segundo ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

Seguiu-se uma nova hidrólise, nas mesmas condições que o ensaio antecedente, mas desta vez usando uma solução enzimática mais concentrada (2 mg/mL) como se verifica na Tabela 10. A quantidade de açúcares produzidos ao longo do tempo desta reacção, são apresentados na Figura 21, onde se denota até aos 60 minutos uma fase de aumento cada vez menos acelerado e se verifica que a partir desse instante foi atingido o patamar da hidrólise, não sendo a xilanase capaz de promover a formação de mais açúcares redutores.

Tabela 10: Condições em que foi realizado o terceiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	0,661
V (tampão no reactor) (mL)	10
C (enzima) (mg/mL)	2
V (enzima no reactor) (mL)	0,25

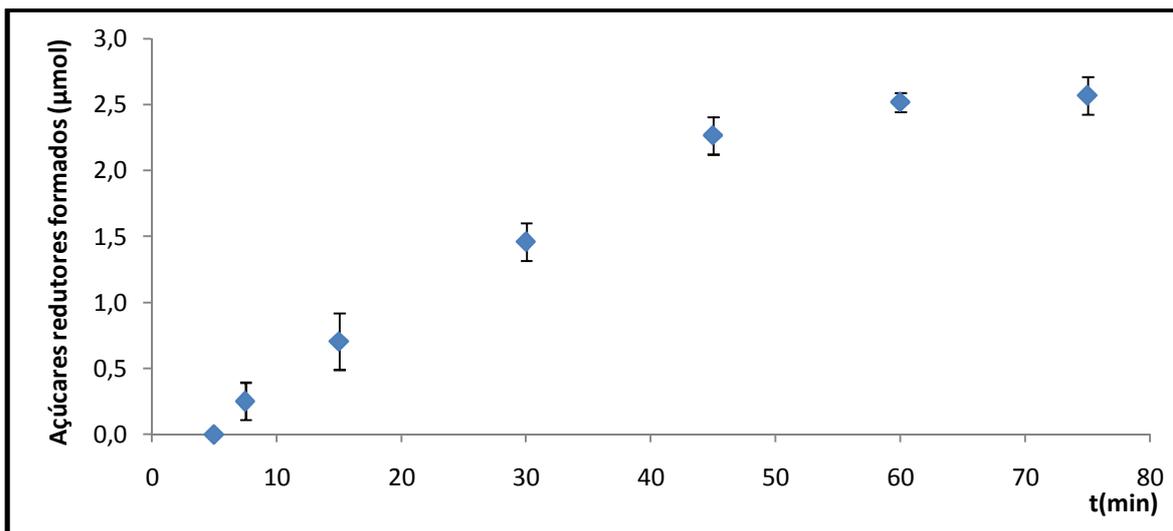


Figura 21: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o terceiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

Embora 60 minutos já represente um tempo razoável para atingir a quantidade máxima de produto formado optou-se por aumentar para o dobro a concentração da solução enzimática (4 mg/mL) de forma a conseguir alcançar mais rapidamente o patamar, diminuindo deste modo o tempo necessário para realizar as experiências. Na Tabela 11, apresentam-se as condições operatórias correspondentes às alterações mencionadas anteriormente.

Tabela 11: Condições em que foi realizado o quarto ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	0,629
V (tampão no reactor) (mL)	10
C (enzima) (mg/mL)	4
V (enzima no reactor) (mL)	0,25

A Figura 22 ilustra a quantidade de açúcares produzidos ao longo do tempo de reacção, para as novas condições experimentais.

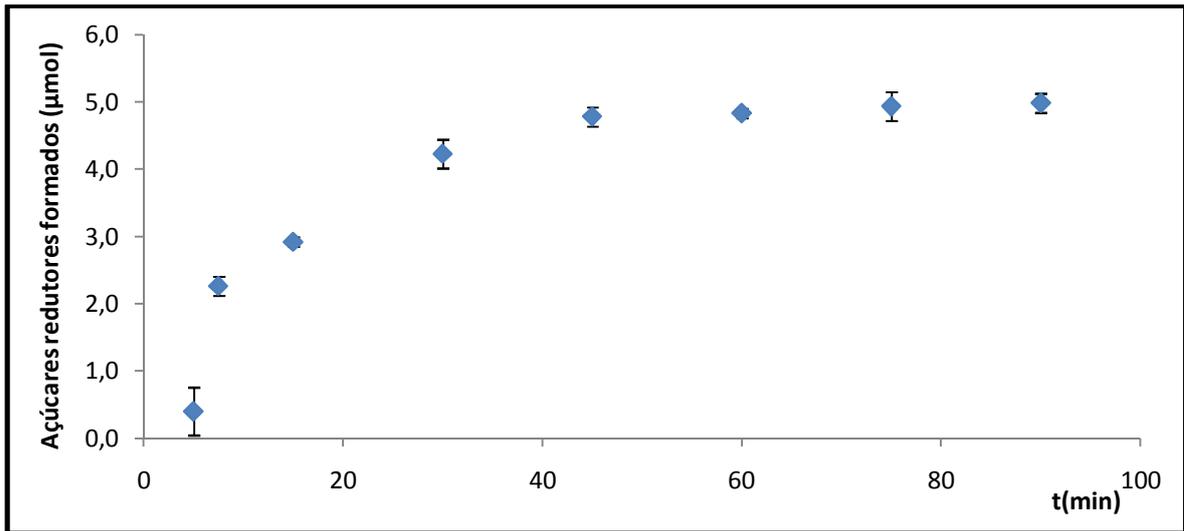


Figura 22: Representação gráfica do produto formado em função do tempo de reacção para o quarto ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

A análise da figura revela não só um aumento da quantidade de açúcares produzida, como também uma diminuição no tempo necessário para atingir o patamar, tendo-se encontrado com este ensaio as condições experimentais óptimas para a realização da hidrólise da pasta kraft com xilanase. É ainda possível verificar que a velocidade de formação de açúcares redutores formados vai diminuindo ao longo do tempo de reacção, estando esta tendência relacionada com o facto da quantidade de substrato disponível ser cada vez menor. No instante em que a enzima deixa de ter substrato para clivar, a quantidade de açúcares produzidos mantém-se constante, sendo possível afirmar que se atingiu o patamar da hidrólise.

Estes três últimos ensaios realizados, diferem entre si apenas na concentração da solução enzimática utilizada. Deste modo, considerou-se interessante representar a quantidade de açúcares redutores produzidos em função da concentração da solução enzimática para diferentes tempos de reacção (Figura 23).

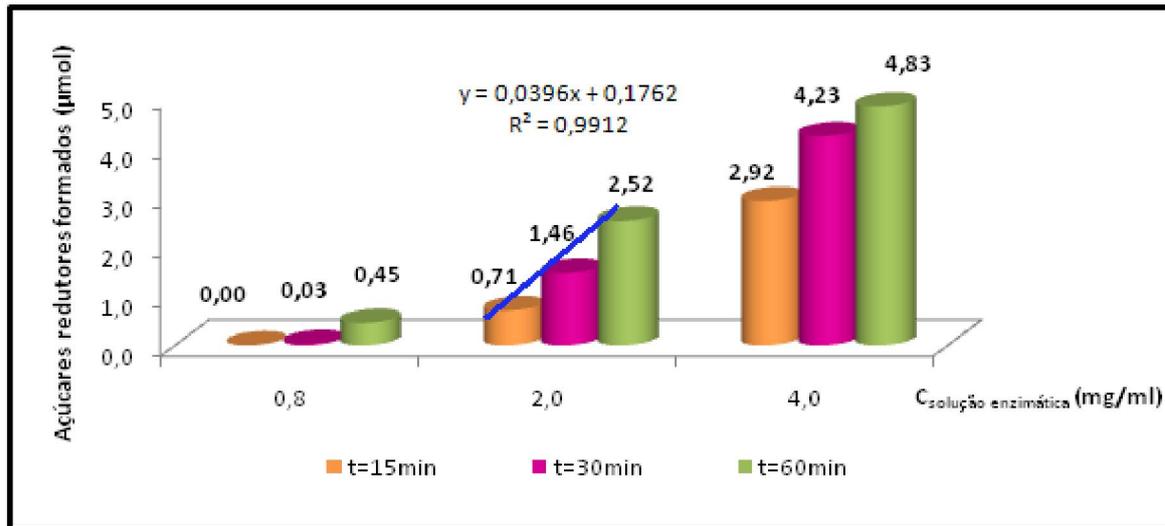


Figura 23: Representação gráfica da quantidade de produto formado em função da concentração da solução enzimática para os tempos pré-estabelecidos e a relação linear entre a quantidade de açúcares redutores formados e o tempo de reacção para a concentração de solução enzimática intermédia.

A análise da Figura 23 revela que, conforme era esperado, quanto maior a concentração da solução enzimática utilizada, maior a quantidade de açúcares redutores formados, sendo esse aumento favorecido por tempos mais longos de hidrólise. É ainda possível verificar que para a concentração da solução enzimática de 2,0 mg/mL e para os tempos analisados (15, 30 e 60 minutos), ainda não ocorre o patamar, existindo linearidade entre a quantidade de açúcares redutores formados e o tempo de reacção enzimática, como é comum acontecer em ensaios enzimáticos.

3.4. Efeito do pré-tratamento de alta pressão hidrostática na pasta kraft

Devido aos ensaios anteriormente efectuados terem permitido conhecer como se comporta a pasta kraft face à hidrólise enzimática, hidrolisaram-se sob as mesmas condições experimentais, amostras de pasta kraft previamente submetidas a diferentes tratamentos hiperbáricos, onde se fizeram variar os parâmetros “pressão” e “tempo de pressurização”. Com este estudo pretendeu-se avaliar quais os efeitos que o pré-tratamento das pastas a alta pressão hidrostática poderia exercer quer sobre a velocidade, quer sobre a extensão da reacção de hidrólise com xilanase. Para efeitos de comparação, para todos os ensaios efectuados foi realizado um ensaio controlo, correspondente à hidrólise enzimática de pasta não submetida ao efeito da alta pressão. Ressalta-se ainda que todas as reacções de

hidrólise executadas na pasta pré-tratada foram realizadas em duplicado e que, para a representação gráfica da quantidade de açúcares redutores formada ao longo do tempo, foram considerados os valores referentes à média aritmética entre as duas réplicas.

O estudo iniciou-se com a hidrólise enzimática de pasta kraft pré-processada a 200 MPa durante 45 minutos, Figura 24. Na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** são apresentadas as condições operatórias referentes a cada à hidrólise de cada uma das réplicas.

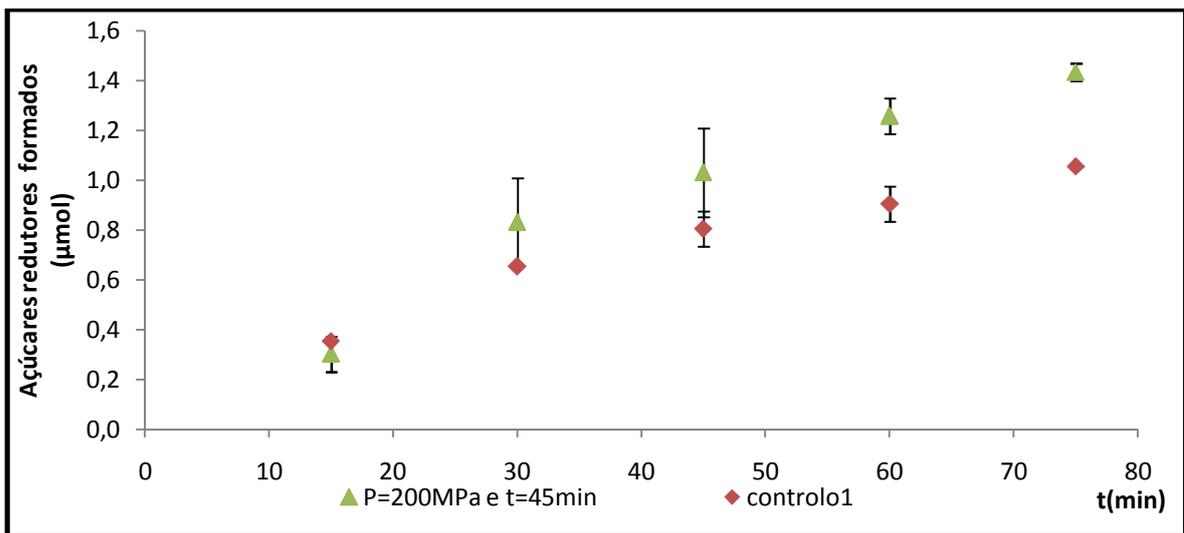


Figura 24: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 200MPa durante 45 minutos

Por análise da figura observa-se que comparada com a amostra controlo, a hidrólise da pasta pré-processada a 200 MPa promoveu a formação de uma maior quantidade de açúcares redutores. Acrescenta-se ainda que após 75 minutos de reacção se atinge uma produção máxima de açúcares redutores cerca de 40% superior ao valor conseguido pela pasta controlo. Este comportamento demonstra que o tratamento hiperbárico aumentou a acessibilidade das xilanas face à hidrólise enzimática.

A actividade da enzima ao longo do tempo de reacção para ambas as amostras é apresentada na Figura 25.

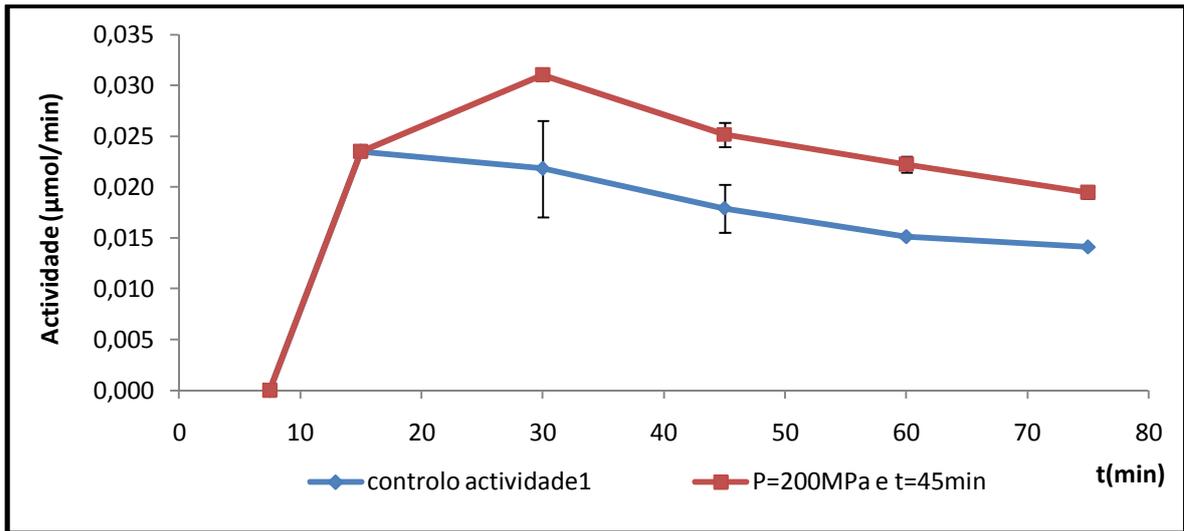


Figura 25: Comparação da actividade enzimática da xilanase ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 200MPa durante 45 minutos

Por observação gráfica verifica-se a um máximo de actividade para a pasta que serve de controlo de 0,022 µmol/min para um tempo de reacção de 15 minutos. Já a pasta que foi processada em alta pressão previamente à reacção de hidrólise manifesta um máximo de actividade para os 30 minutos de reacção sendo o seu valor 0,031 µmol/min. Comparando a pasta controlo com a pasta pré-tratada a 200MPa durante 45 minutos verifica-se que as diferenças entre as duas, só são notórias a partir dos 15 minutos de reacção. A partir desse instante, a actividade enzimática no sistema reaccional que envolve a pasta processada a alta pressão é mais elevada, comprovando o aumento da acessibilidade da enzima ao substrato.

Seguidamente foi executado o mesmo procedimento, submetendo agora as amostras de pasta a 300 MPa durante intervalos de tempo de 15 e 45 minutos, de modo a testar as alterações que o aumento de pressão e tempo de pressurização do pré-tratamento provocavam na reacção de hidrólise. A Figura 26 ilustra os resultados obtidos.

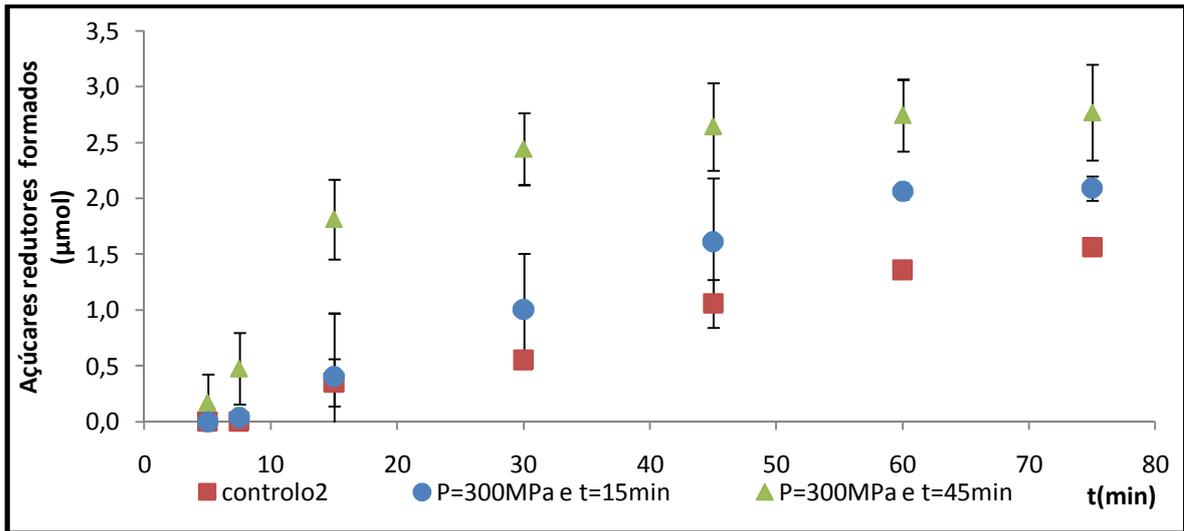


Figura 26: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 300MPa durante 15 e 45 minutos

Analisando a Figura 26 verifica-se que para tempos curtos de reacção não existem diferenças significativas entre a pasta não sujeita a pré-tratamento e a pasta sujeita a uma pressão de 300 MPa durante 15 minutos. Este comportamento altera-se a partir dos 30 minutos de reacção, onde se começam a registar as primeiras diferenças em termos de quantidade de açúcares redutores formados. Por outro lado, a pasta pré-tratada a 300 MPa durante um tempo de processamento mais longo (45 minutos) apresenta efeitos notórios, não só para tempos longos de reacção, como também para os instantes iniciais, onde, desde cedo se começa a destacar relativamente às restantes pastas. A aplicação deste tratamento hiperbárico (300 MPa durante 45 minutos) na pasta previamente à reacção de hidrólise fez com que nos primeiros 15 minutos de reacção se obtivesse uma quantidade de açúcares redutores superior à que se observa no final da reacção de hidrólise da pasta controlo. Ainda relativamente à pasta pré-processada a 300 MPa durante 45 minutos, verifica-se que provavelmente a enzima conseguiu alcançar regiões que perante outras condições experimentais se encontravam inacessíveis, atingindo-se uma maior velocidade de hidrólise (aumentou a quantidade de açúcares redutores produzidos no mesmo tempo de reacção).

O efeito da pressão repercute-se na actividade da enzima, sendo o seu efeito mais evidente na pasta tratada à pressão de 300MPa durante 45 minutos, para os 15 minutos iniciais de reacção (Figura 27). Com esta amostra, para este tempo de reacção, conseguiu-se um aumento da actividade da xilanase de cerca de 80%. Este aumento é devido a um

acesso mais facilitado da enzima ao substrato. No caso da pasta processada a 300 MPa durante 15 minutos o efeito da pressão também se faz sentir na actividade da enzima, embora de forma menos significativa e só a partir dos 15 minutos de reacção.

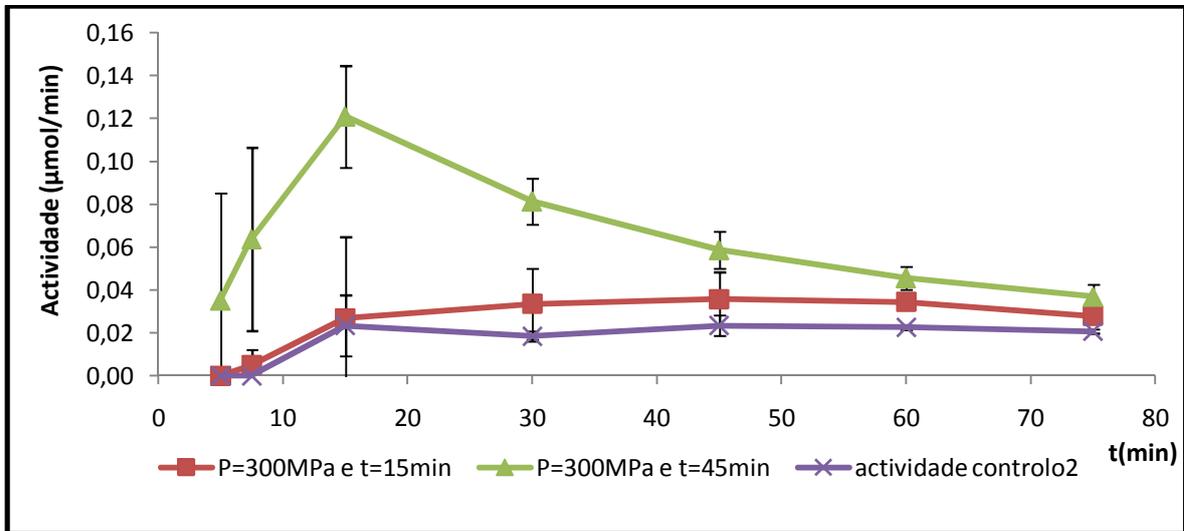


Figura 27: Comparação da actividade enzimática da xilanase ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 300MPa durante 15 e 45 minutos

De forma análoga à executada anteriormente, também se analisou o impacto que um tratamento de 400 MPa durante 15 e 45 minutos poderia ter na hidrólise enzimática da pasta kraft Figura 28.

Os resultados evidenciam um claro aumento da quantidade de produto formado nas pastas pré-tratadas relativamente à pasta de controlo. Comparando o comportamento das pastas submetidas a 400 MPa durante 15 e 45 minutos não se verificam diferenças notórias no que diz respeito à quantidade de açúcares redutores formados, demonstrando que para esta pressão não é compensatório sujeitar as pastas a processamento hiperbárico superiores a 15 minutos.

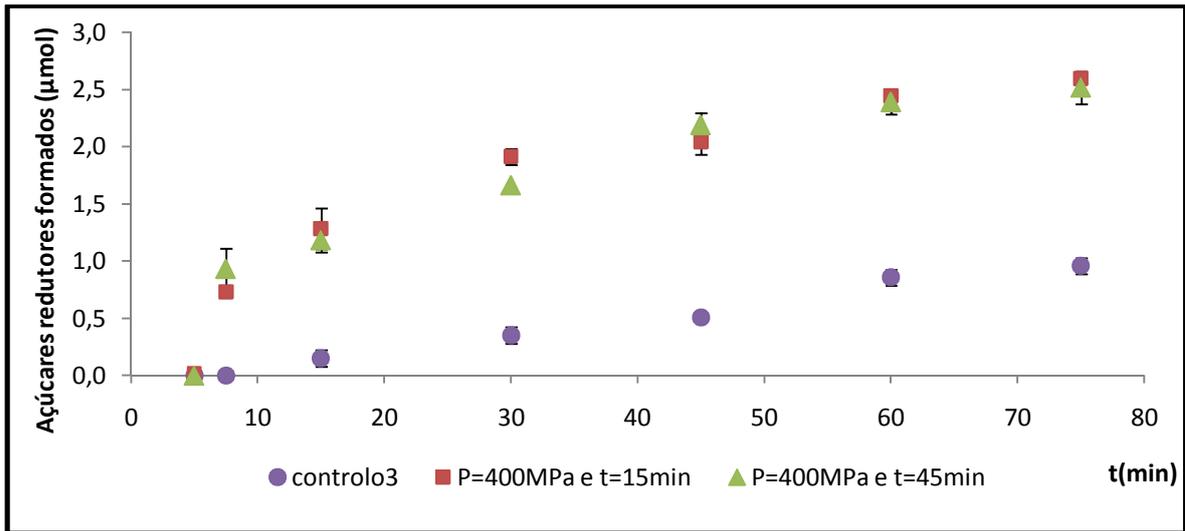


Figura 28: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 400MPa durante 15 e 45 minutos

Tal como acontece relativamente à quantidade de açúcares redutores formados, também a actividade enzimática da xilanase nas pastas tratadas à pressão de 400 MPa durante 15 e 45 minutos não apresenta diferenças significativas, como pode ser observado na Figura 29. Contudo, é de referir que se assiste a um aumento significativo da actividade da enzima nas pastas tratadas a 400 MPa comparativamente à pasta controlo, sendo esta diferença mais visível nos instantes iniciais da reacção.

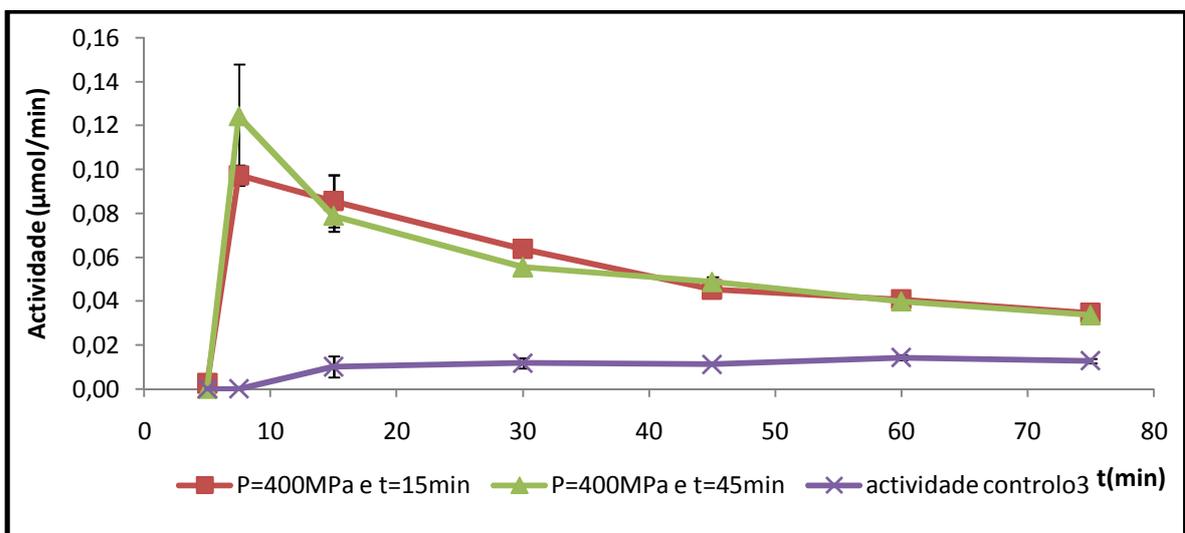


Figura 29: Comparação da actividade enzimática da xilanase ao longo da hidrólise das amostras de pasta com e sem pré-tratamento hiperbárico de 400MPa durante 15 e 45 minutos

De forma a sistematizar todos os resultados obtidos apresenta-se na Figura 30 a percentagem de variação dos açúcares redutores formados para as diferentes pastas pré-tratadas, relativamente à pasta que serve de controlo para cada pressão de processamento.

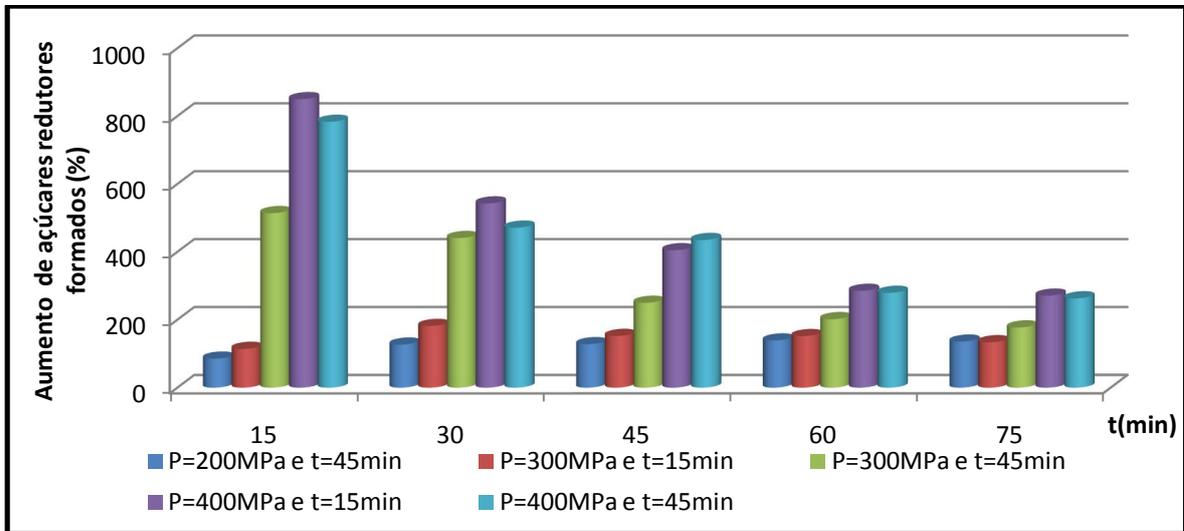


Figura 30: Representação gráfica da percentagem de aumento do produto formado relativamente à pasta sem pré-tratamento de alta pressão em função do tempo

É possível verificar que um aumento na pressão a que a pasta é submetida antes da reacção de hidrólise favorece um maior aumento dos açúcares redutores formados. As pastas pressurizadas a 400 MPa durante 15 e 45 minutos destacam-se claramente nos instantes iniciais da reacção face às restantes, alcançando crescimentos na ordem dos 850% e 783% respectivamente.

Não se observam diferenças significativas entre os resultados obtidos pela amostra de pasta pré-tratada a 200 MPa durante 45 minutos e a amostra pressurizada a 300 MPa por 15 minutos. Contudo, ao prolongar o tempo de pressurização da amostra pré-tratada a 300 MPa para 45 minutos verificou-se um notável aumento na formação de açúcares redutores durante os primeiros 45 minutos de reacção, evidenciando que o aumento do tempo sob o qual a amostra se encontra sob pressão promoveu uma maior acessibilidade da pasta perante o ataque enzimático da xilanase. Relativamente às amostras submetidas a 400 MPa, tal como foi acima discutido, conclui-se que o aumento do tempo de pressurização não se traduziu num maior crescimento de açúcares redutores formados, sendo a pasta tratada a 400 MPa durante 15 minutos a que atinge um maior crescimento (superior a 800%).

Os comportamentos observados podem ser explicados esquematicamente pela Figura 31, onde se descreve o efeito que o pré-tratamento hiperbárico exerce na acessibilidade da pasta kraft face à hidrólise enzimática com xilanase. Na parede celular da fibra celulósica, as hemiceluloses encontram-se associadas a outros componentes como celulose, lenhina e outras substâncias que dificultam o acesso da enzima às xilanas. No entanto, pensa-se que são as microfibrilas de celulose as principais responsáveis por este acesso limitado e que, quando sujeitas a altas pressões sofrem re-arranjos que alteram a acessibilidade das xilanas face à hidrólise enzimática.

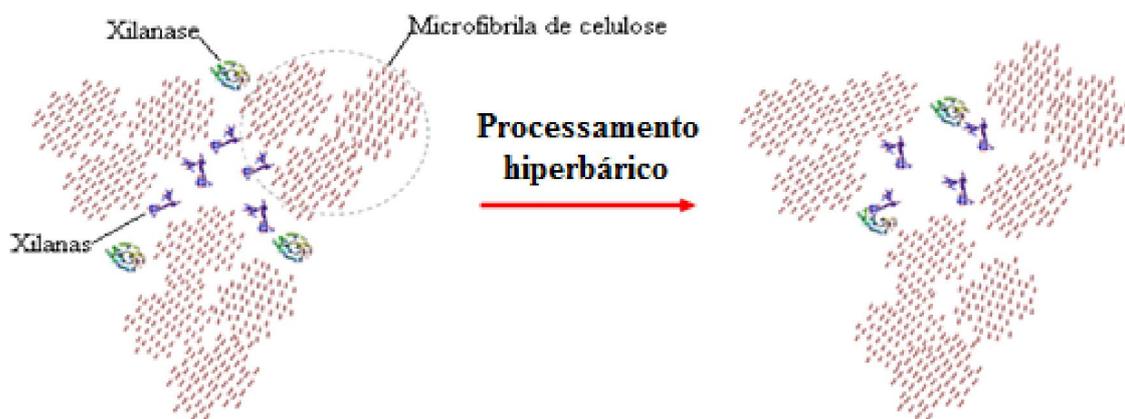


Figura 31: Representação esquemática do efeito do processamento hiperbárico sobre a acessibilidade das microfibrilas de celulose face à hidrólise enzimática com xilanase

Conforme se ilustra na Figura 31, julga-se que o pré-tratamento hiperbárico da pasta kraft seja responsável por conduzir a uma re-organização das microfibrilas. Quando submetidas ao efeito da alta pressão, as fibrilas elementares adjacentes aproximam-se, havendo tendência para se agregarem e co-cristalizarem entre si. Por sua vez, as fibrilas que se encontravam mais afastadas acabam por sofrer desagregação, levando ao aumento dos espaços interfibrilares, que favorecem um mais fácil acesso da xilanase aquando da reacção de hidrólise. Desta forma, as pastas pressurizadas conseguirão libertar-se de uma maior quantidade de hemicelulose durante a hidrólise do que as pastas não submetidas ao efeito de alta pressão, levando a crer que o processamento hiperbárico pode ser uma ferramenta eficaz para superar os entraves associados à hidrólise enzimática de xilanas através dos métodos convencionais.

Os resultados experimentais obtidos neste estudo revelam ser bastante promissores, pois através do controlo da pressão e do tempo de pressurização do pré-tratamento é possível

aumentar de forma controlada o acesso da enzima às xilanas, removendo-as em certa extensão na pasta. Este comportamento motivou a realização de um novo estudo: avaliar qual o efeito da combinação de xilanase e celulase na hidrólise da pasta kraft. O efeito da alta pressão na acessibilidade da celulose face à hidrólise com celulase foi alvo de uma tese de mestrado a decorrer paralelamente a este trabalho, que demonstrou que os melhores resultados alcançados correspondiam a pasta pré-tratada a 400 MPa durante 15 minutos previamente à reacção de hidrólise. Pretendeu-se avaliar se ao hidrolisar esta pasta pré-pressurizada, numa primeira fase com xilanase e, numa segunda fase com celulase, se conseguiria hidrolisar celulose em maior extensão, visto esta já se encontrar rodeada por uma menor quantidade de hemiceluloses.

Na Figura 32 apresenta-se o efeito que a combinação das duas enzimas exerce sobre a quantidade de açúcares redutores formados.

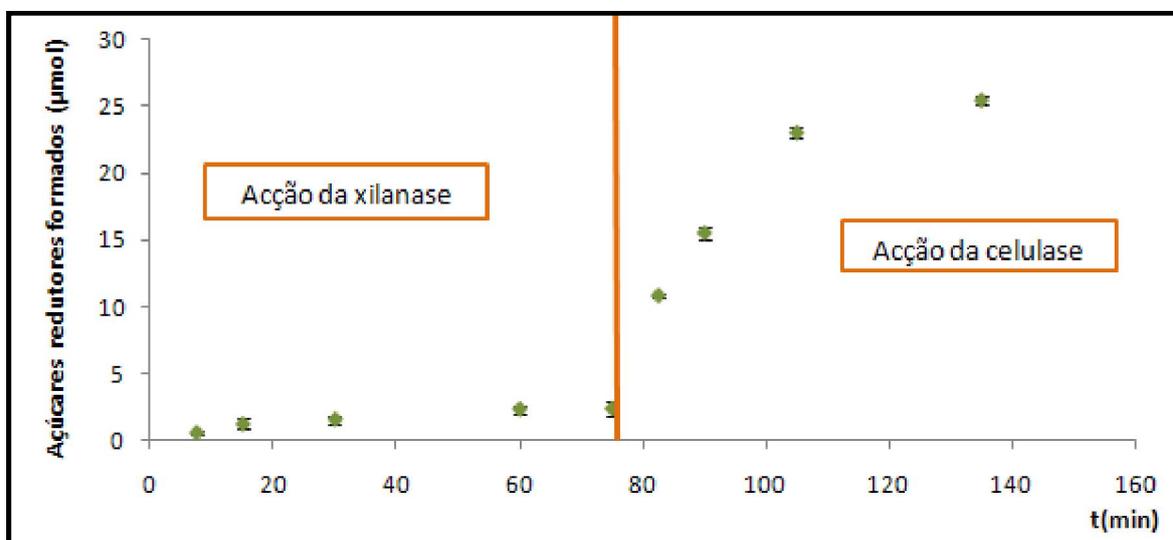


Figura 32: Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo de reacção para as pastas processadas a 400MPa durante 15 minutos e hidrolisadas apenas pela xilanase e pela combinação xilanase/celulase

Por análise da Figura 32 verifica-se um aumento bastante significativo da quantidade de açúcares redutores formados aquando da hidrólise com a acção combinada das duas enzimas. Com esta combinação foi possível obter uma produção máxima de 25,43 µmol de açúcares redutores após uma hora de reacção enzimática com celulase. É também visível por análise gráfica que esta combinação possibilita hidrolisar mais rapidamente os xilanas

(maior actividade nos instantes iniciais) e ainda possibilita o acesso a xilanas que anteriormente estavam inacessíveis à enzima (houve aumento do valor do patamar).

De forma a caracterizar e quantificar os açúcares hidrolisados pela combinação xilanase/celulase, assim como avaliar as consequências da sua acção sob a quantidade de açúcares neutros que permaneceram na pasta após hidrólise, realizaram-se análises das diferentes amostras por cromatografia gasosa.

3.5. Teor de açúcares neutros da pasta kraft de *E. globulus* após hidrólise enzimática

Para além de acompanhar as reacções de hidrólise ao longo do tempo através da quantificação dos açúcares redutores formados, foi ainda importante avaliar quais os açúcares neutros que permanecem na pasta após hidrólise, segundo as diversas condições experimentais testadas. A quantidade total de xilose removida foi avaliada por comparação com os açúcares presentes na pasta kraft inicial, não pressurizada e não hidrolisada. Os resultados obtidos podem ser consultados na Tabela 12.

Tabela 12: Açúcares neutros presentes na pasta kraft de *Eucalyptus globulus* submetida a diferentes condições experimentais

Monossacarídeos anidros neutros (%)		Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Ramnose	Fucose	Glucose
Pasta seca		0,3	15,8	0,4	0,2	0,2	0,1	83,0
Hidrolisado de pasta sem pré-tratamento		2,5	14,8	0,2	0,3	0,0	0,0	82,2
Hidrolisados de pasta tratada	300 MPa 45min.	0,1	12,6	0,1	0,1	0,0	0,0	87,1
Hidrolisado da pasta tratada com xilanase e celulase	400 MPa 15 min.	0,0	9,3	0,0	10,2	0,0	0,0	80,5

Segundo as condições de hidrólise testadas, verificou-se que a pasta sem pré-tratamento hiperbárico após ser hidrolisada com xilanase apenas conseguiu remover 1% da xilose inicialmente presente. No entanto, ao pressurizar a pasta a 300 MPa durante 45 minutos previamente à reacção de hidrólise conseguiu-se degradar 3,2% de xilose, uma quantidade três vezes superior à apresentada pela pasta hidrolisada sem pré-tratamento. Ao estudar o efeito proporcionado pela acção combinada da xilanase com celulase, obtém-se uma diminuição de xilose de 6,5%, reduzindo o valor inicial deste monossacarídeo para 9,3%. Ainda para esta pasta, a quantidade de glucose presente baixou 2,5% face à pasta inicial.

Os resultados obtidos levam a sugerir que a hidrólise enzimática da pasta não submetida ao tratamento hiperbárico apenas consegue remover as xilanas que se encontram na superfície das fibrilas elementares, mantendo parcialmente intactas as que se situam nas zonas interfibrilares. Contudo, ao submeter a pasta a um pré-tratamento a alta pressão previamente à reacção de hidrólise com xilanase, consegue-se aumentar a acessibilidade da pasta à acção da enzima, hidrolisando também xilanas presentes em zonas que anteriormente eram de difícil acesso, como as zonas intermicrofibrilares. Os resultados mais interessantes surgem quando a pasta pré-tratada é sujeita à acção da xilanase, seguida de celulase. Para esta amostra, obteve-se uma diminuição de xilose muito promissora, que

se atribui em grande parte à acção da celulase. Pensa-se que ao actuar sobre a celulose, a celulase elimine também os componentes não celulósicos que a ela estejam associados, contribuindo para uma diminuição acentuada da xilose presente na pasta.

3.6. Análise da imagem de suspensões de pastas kraft ao microscópio

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos, foram observadas amostras de pastas com/sem pré-tratamento hiperbárico num microscópio de luz polarizada (Figura 33).

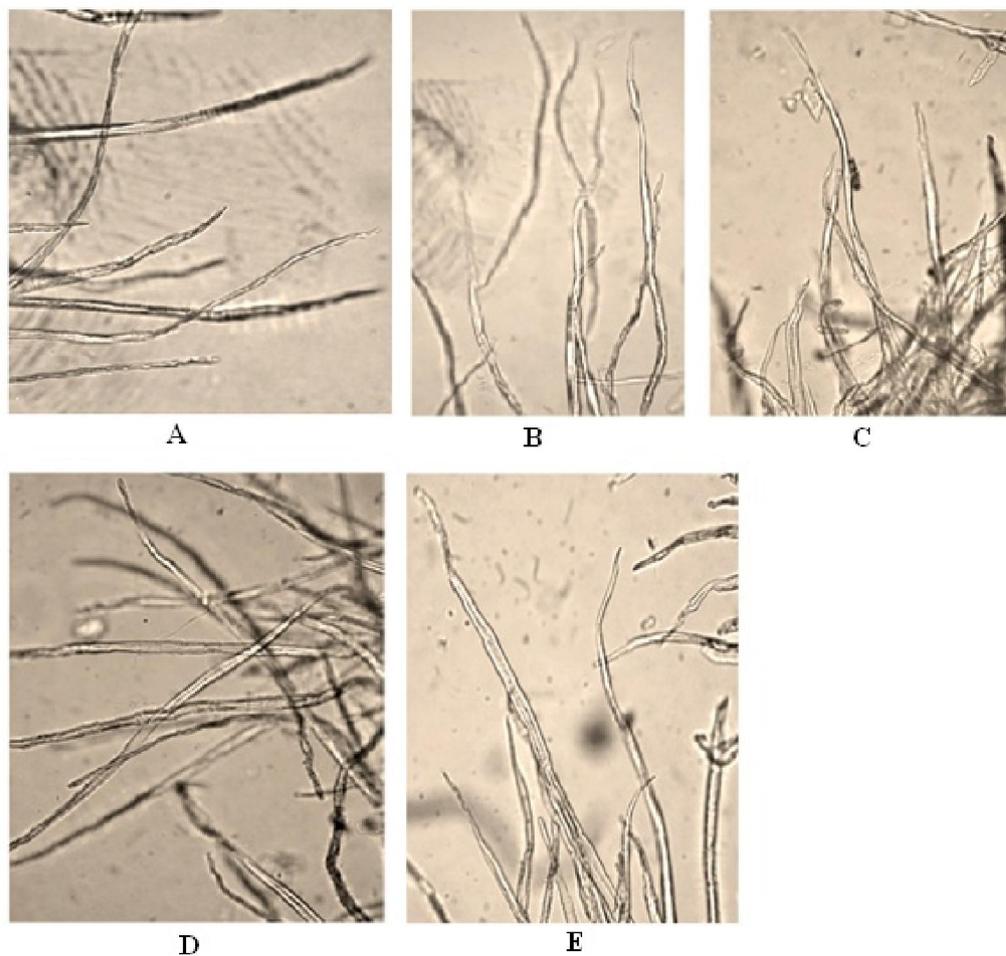


Figura 33: Observação microscópica da pasta sem tratamento de alta pressão 20 x (A), pasta pré-tratada a 200MPa durante 45 minutos 20 x (B), pasta pré-tratada a 300MPa durante 15 minutos 20 x (C) pasta pré-tratada a 300MPa durante 45 minutos 20 x (D), pré-tratada a 400MPa durante 15 minutos 20 x (E)

As imagens de A a E permitem estudar o efeito que o processamento a alta pressão exerce sobre as fibras da pasta. Através da sua observação é possível concluir que o

tratamento hiperbárico conduz ao aumento do diâmetro das fibras. Este comportamento já foi estudado por outros investigadores, **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** que comprovaram que o tratamento a alta pressão promove a penetração de moléculas de água fortemente ligada na pasta. Esta hidratação faz com que as fibras se apresentem mais intumescidas e flexíveis.

Para além das suspensões anteriores foi também observado ao microscópio os hidrolisados da pasta com e sem o efeito da alta pressão (Figura 34).

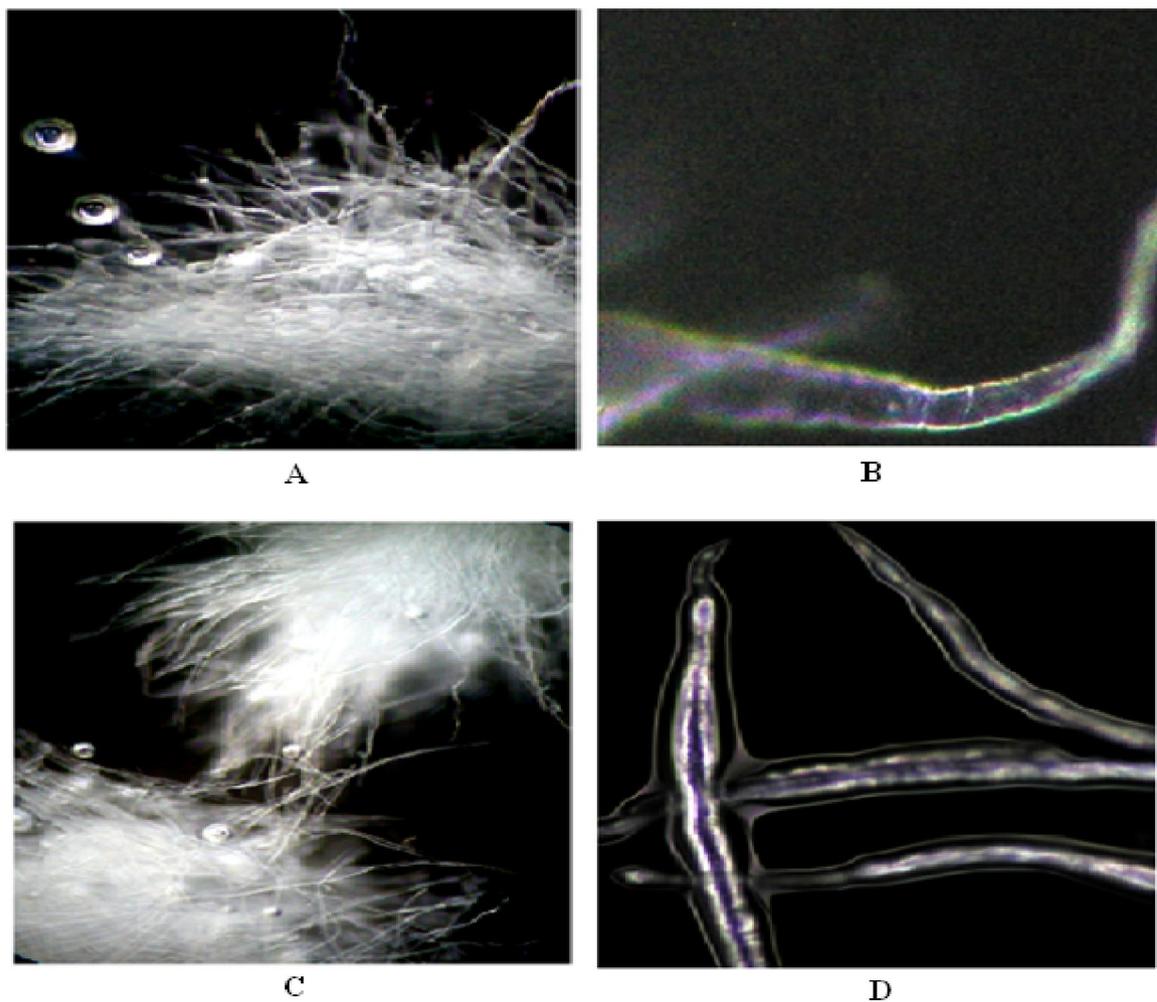


Figura 34: Observação ao microscópio do hidrolisado da pasta sem tratamento de alta pressão 10 x (A), hidrolisado da pasta sem tratamento de alta pressão 50 x (B), hidrolisado da pasta pré-tratada a 300 MPa durante 45 minutos 10 x (C), hidrolisado da pasta pré-tratada a 300 MPa durante 45 minutos 50 x (D)

Comparando as imagens A e C da Figura 34, na ampliação utilizada não existem diferenças significativas entre o hidrolisado da pasta sem pré-tratamento de pressão e o

hidrolisado da pasta pressurizada. No entanto, numa ampliação 5 vezes superior já é possível distinguir as amostras entre si. Enquanto na imagem B o “esqueleto” da fibra celulósica se mantém praticamente inalterado, já na imagem D observa-se a superfície da fibra gelificada e com aspecto translúcido, que está correlacionado com a remoção das xilanas.

Uma das maiores dificuldades presentes nas reacções de hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos, concretamente das xilanas, está relacionada com o difícil acesso da enzima ao substrato. Deste modo, para que a hidrólise enzimática seja eficiente, é preciso que as enzimas tenham amplo acesso ao substrato, ou seja, é necessário “abrir” a estrutura da fibra vegetal de forma a permitir uma rápida digestão das xilanas. Este consistiu no principal desafio deste trabalho, onde se pretendeu estudar o efeito que o processamento hiperbárico de amostras de pastas kraft de *Eucalyptus globulus* exerce sobre a sua acessibilidade perante a hidrólise enzimática com xilanase.

De uma forma geral, verificou-se que o tratamento a altas pressões hidrostáticas provoca o re-arranjo das microfibrilas, proporcionando o aumento dos espaços intermicrofibrilares e, por consequência, facilitando a acção da xilanase sobre as hemiceluloses correspondentes.

Após testar diferentes combinações de pressões e tempos de pressurização, verificou-se que as condições que favoreciam uma hidrólise mais extensa das xilanas correspondiam à pasta pré-tratada a 400 MPa durante 15 minutos. Para esta amostra, e decorridos apenas 15 minutos após o início da reacção, obteve-se uma quantidade de açúcares redutores formados cerca de 8 vezes superior à pasta não submetida ao efeito da alta pressão. Aparentemente, o processamento a alta pressão aparenta ser capaz de ultrapassar os entraves actualmente existentes na hidrólise enzimática da xilose presente na pasta celulósica através dos métodos convencionais.

A hidrólise enzimática da pasta pré-tratada a 400 MPa durante 15 minutos, primeiramente com xilanase e posteriormente com celulase, permitiu reduzir o teor de xilose na pasta para 9,3% comparativamente aos 15,8% presentes na pasta inicial (não hidrolisada e não submetida ao efeito da alta pressão).

Ficou provado que para as condições experimentais testadas, a variação dos parâmetros pressão/tempo de pressurização permitem o controlo da quantidade de xilose presente na pasta após hidrólise, abrindo novos caminhos na engenharia das fibras. Desta forma, consoante o fim a que a pasta se destina, é possível programar o teor de xilose nela presente. Para além disso, a xilose removida pode ser recuperada e utilizada para produtos de alto valor acrescentado.

Bibliografia

- [1] <http://www.celpa.pt> (consultado em 27/10/2010).
- [2] http://www.celpa.pt/images/articles/199/ciclo_floresta.pdf (consultado em 28/10/2010).
- [3] Patt, R.; Kordsachia, O.; Fehr, J., European hardwoods versus *Eucalyptus globulus*, as a raw material for pulping. *Wood Science and Technology* **2006**, *40* (1), 39-48.
- [4] Boletim estatístico da indústria papeleira portuguesa CELPA. http://www.celpa.pt/images/pdf/art209_pt_be_2000.pdf (consultado em 28/10/2010).
- [5] Sjöström, E., *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*. 2 ed.; Academic Press: Nova Iorque, 1993.
- [6] Morais, S. A. L. d.; Nascimento, E. A. d.; Melo, D. C. d., Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. *Revista Árvore* **2005**, *29*, 461-470.
- [7] Lisboa, S. A. B. Dissolução e precipitação de xilanas durante o cozimento kraft de *e. Globulus*. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.
- [8] Klock U., G. I., Hernandez, J., Andrade, A. Química da madeira. <http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/quimicadamadeira.pdf> (consultado em 26/9/2010).
- [9] Santos, F. Efeito do teor e estrutura de xilana de pastas brancas de *E. globulus* na sua tendência para a hornificação. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2005.
- [10] Sticklen, M. B., Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 315-319.
- [11] Parham, R., *Ultra-Structure and Chemistry, Wood structure: softwoods and hardwoods*. 3 ed.; Atlanta, Monte Real, 1983; Vol. 1.
- [12] Kohler, R., Alex, R., Briemann, R., Ausperger, B.; , A New Kinetic Model for Water Sorption Isotherms of Cellulosic Materials. *Macromolecular Symposia* **2006**, *244* (1), 89-96.

-
- [13] Pascoal, C., Evtuguin, D., Pinto, P., Silvestre, A., Freire, C., Química da madeira de *eucalyptus globulus*: Especificidades e impacto nos processos de cozimento e de branqueamento. *Pasta e Papel* **2005**, (7), 32-42.
- [14] Bastawde, B., Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **1992**, 8 (4), 353-368.
- [15] Laine, C. Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Tese de Doutorado, Universidade Tecnológica de Helsínquia, Espoo, Finlândia, 2005.
- [16] Evtuguin., D., Tomás, J., Silva, A., Neto, C., Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research* **2003**, 338 (7), 597-604.
- [17] Fengel, D., Wegener, G., *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. 2 ed.; Walter de Gruyter & Co: Berlim, 1983.
- [18] Rowell, R., *Handbook of wood chemistry and wood composites*. 2 ed.; CRC press: Estados Unidos da América, 2005.
- [19] Smook, G., *Handbook for Pulp & Paper Technologist*. 3 ed.; Tappi Pr.: Vancouver, 2002.
- [20] Nascimento, V. Estudo da influência dos componentes da pasta kraft de *E. globulus* sobre o índice kappa e brancura. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2005.
- [21] Zibetti, A. Desenvolvimento de um sistema reaccional de hidrólise enzimática de tributirina para aplicação em biosensor indicador de tempo e temperatura. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2008.
- [22] Gama, M., Barros, M., Cabral, J., *Engenharia Enzimática*. 3 ed.; Lidel: 2003; Vol. 1.
- [23] Nelson, D., Cox, M. , *M. Lehninger – Princípios de Bioquímica*. 3 ed.; Edgard Blucher: São Paulo, 2002; Vol. 1.
- [24] Saha, B., Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2003**, 30 (5), 279-291.
- [25] Shallom, D., Shoham, Y., Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* **2003**, 6 (3), 219-228.
- [26] Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G., Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, 56 (3), 326-338.

- [27] Biely, P., Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* **1985**, 3 (11), 286-290.
- [28] Collins, T., Gerday, C., Feller, G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **2005**, 29 (1), 3-23.
- [29] Prade, R., Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **1996**, 13, 100-131.
- [30] Magalhães, P. Purificação de hemicelulases e uma β - glicosidade de *Ceriporiopsis subvermispora* produzidas em condições de biopolpação. Tese de Doutorado, Faculdade De Engenharia Química de Lorena, Lorena - São Paulo, 2005.
- [31] Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D., Endo-[beta]-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology* **1997**, 57 (1-3), 151-166.
- [32] Monte, J. Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulases e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, Lorena - São Paulo, 2009.
- [33] Jeffries, T., Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Current Opinion in Biotechnology* **1996**, 7 (3), 337-342.
- [34] Christakopoulos, P., Katapodis, P., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B., Stamatis, H., Skaltsa, H., Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. *International Journal of Biological Macromolecules* **2003**, 31 (4-5), 171-175.
- [35] Vieira, D. Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanas: um estudo via simulação molecular. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- [36] Zheng, L., Du, Y., Zhang, J., Biobleaching effect of xylanase preparation from an alkalophilic *Bacillus sp.* on ramie fibers. *Biotechnology Letters* **2000**, 22 (17), 1363-1367.
- [37] Dahlberg, L., Holst, O., Kristjansson, J., Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1993**, 40 (1), 63-68.
- [38] Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., Amorim, D., Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, 67 (5), 577-591.

-
- [39] Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K., Steiner, W., Zupancic, S., Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology* **1996**, 58 (2), 137-161.
- [40] Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **1999**, 23 (4), 411-456.
- [41] Araújo, J., Moraes, F., Zanin, G., Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1999**, 79 (1), 713-722.
- [42] Gil, N., Gil, C., Amaral, M., Costa, A., Duarte, A., Use of enzymes to improve the refining of a bleached *Eucalyptus globulus* kraft pulp. *Biochemical Engineering Journal* **2009**, 46 (2), 89-95.
- [43] Bhardwaj, N., Bajpai, P., Bajpai, P., Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability. *Journal of Biotechnology* **1996**, 51 (1), 21-26.
- [44] Diniz, D. Produção de álcool etílico utilizando como matérias-primas resíduos florestais e agrícolas. Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.
- [45] Sousa, H. Aplicação de celulases e xilanases na reciclagem de fibras de papel. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Braga, 2002.
- [46] Gould, J., Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering* **1984**, 26 (1), 46-52.
- [47] Schell, D., Torget, R., Power, A., Walter, P., Grohmann, K., Hinman, N., A technical and economic analysis of acid-catalyzed steam explosion and dilute sulfuric acid pretreatments using wheat straw or aspen wood chips. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1991**, 28-29 (1), 87-97.
- [48] Rivers, D., Emert, G., Lignocellulose pretreatment: A comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnology Letters* **1987**, 9 (5), 365-368.
- [49] Holtzapfle, M., Humphrey, A., The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnology and Bioengineering* **1984**, 26 (7), 670-676.
- [50] Rahman, M., *Handbook of Food Preservation*. 1 ed.; CRC Press: Estados Unidos da América, 1998.
- [51] Figueiredo, A., Evtuguin, D., Saraiva, J., Effect of high pressure treatment on structure and properties of cellulose in eucalypt pulps. *Cellulose* **2010**, 17 (6), 1193-1202.

-
- [52] Marques, C. Efeito de tratamentos de alta pressão na cinética de inativação térmica e reactivação da peroxidase. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.
- [53] Brites, A., Rosa, F., Rendeiro, J., Gomes, M., Vieira, T. Altas pressões na indústria alimentar. Trabalho académico, Instituto politécnico de Coimbra Coimbra, 2010.
- [54] Pinto, A. Efeito da alta pressão na actividade da enzima peroxidase. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.
- [55] Weise, U., *Hornification : mechanisms and terminology*. Suomen paperi- ja puutavaralehti oy: Helsinquia, Finlândia, 1998; Vol. 80.
- [56] Newman, R., Carbon-13 NMR evidence for cocrystallization of cellulose as a mechanism for hornification of bleached kraft pulp. *Cellulose* **2004**, *11* (1), 45-52.
- [57] Bailey, M., Biely, P., Poutanen, K., Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* **1992**, *23* (3), 257-270.
- [58] Miller, G., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **1959**, *31*, 426-428.
- [59] Sixta, H., *Pulp Properties and Applications em Handbook of pulp*. 2 ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Alemanha, 2008.
- [60] Evtugin, D., Daniel, A., Neto, C., Determination of hexenuronic acid and residual lignin in pulps by UV spectroscopy in Cadoxen solutions. *Journal of pulp and paper science*, **2002**, *28* (6).

Anexos

Anexo A: Tabelas auxiliares

Tabela A 1: Massa de pasta utilizada no calculo do teor de humidade

	Ensaio	$m_{amostra}$ ($\pm 0,001$ g)
Antes de ir à estufa	1	1,035
	2	1,331
Após 30 min na estufa	1	0,955
	2	1,228
Após 4 h na estufa	1	0,952
	2	1,226

Tabela A 2: Massa da pasta utilizada no calculo do teor de extractáveis

Extracção	Ens.	$m_{balão}$ ($\pm 0,001$ g)	$m_{esferas}$ ($\pm 0,001$ g)	$m_{balão+esferas}$ ($\pm 0,001$ g)	$m_{cartuxo}$ ($\pm 0,001$ g)	$m_{cartuxo+pasta}$ ($\pm 0,001$ g)	m_{pasta} ($\pm 0,001$ g)	$m_{extracto}$ ($\pm 0,001$ g)
Antes	1	164,592	0,807	165,399	4,131	5,957	1,826	----
	2	164,053	0,814	164,867	3,535	5,895	2,360	----
Após	1	164,592	0,807	165,399	----	----	----	0,003
	2	164,053	0,814	164,867	----	----	----	0,004

Tabela A 3: Massa da pasta utilizada no calculo do teor de cinzas

Calcinação	Ens.	$m_{cadinho}$ ($\pm 0,001$ g)	$m_{cadinho + pasta}$ ($\pm 0,001$ g)	m_{pasta} ($\pm 0,001$ g)	m_{cinzas} ($\pm 0,001$ g)
Antes	1	12,110	13,199	1,090	---
	2	11,769	12,848	1,079	---
	3	11,561	12,562	1,001	---
Após	1	12,110	12,111	---	0,001
	2	11,769	11,770	---	0,001
	3	11,561	11,562	---	0,001

Tabela A 4: Condições em que foi realizado o primeiro ensaio de hidrólise enzimática do xilano

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	3000
V (substrato no reactor) (mL)	30
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,5
NOTA: As alíquotas retiradas ao longo do tempo foram diluídas 3,5 vezes em tampão	

Tabela A 5: Valores utilizados para o cálculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no primeiro ensaio de hidrólise enzimática do xilano

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
15	0,063	0,119	0,008	0,017	0,099	0,206	33,371	69,657	2,225	4,644	51,51
30	0,147	0,151	0,022	0,022	0,259	0,267	87,800	90,392	2,927	3,013	89,10
45	0,167	0,237	0,025	0,036	0,298	0,432	100,760	146,118	2,239	3,247	123,44
60	0,326	0,328	0,050	0,050	0,602	0,606	203,788	205,084	3,396	3,418	204,44
75	0,350	0,386	0,054	0,060	0,648	0,717	219,339	242,666	2,925	3,236	231,00
90	0,518	0,493	0,081	0,077	0,969	0,921	328,199	311,999	3,647	3,467	320,10
105	0,535	0,610	0,083	0,095	1,002	1,145	339,214	387,812	3,231	3,693	363,51
120	0,620	0,628	0,097	0,098	1,165	1,180	394,292	399,476	3,286	3,329	396,88

Tabela A 6: Condições em que foi realizado o segundo ensaio de hidrólise enzimática do xilano

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
V (substrato no reactor) (mL)	15
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,5
NOTA: As alíquotas retiradas ao longo do tempo foram diluídas 9 vezes em tampão	

Tabela A 7: Valores utilizados para o cálculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no segundo ensaio de hidrólise enzimática do xilano

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,003	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,025	0,018	0,002	0,001	0,027	0,013	20,746	10,373	1,383	0,692	15,559
30	0,042	0,039	0,005	0,004	0,059	0,054	45,937	41,492	1,531	1,383	43,714
45	0,063	0,062	0,008	0,008	0,100	0,098	77,056	75,574	1,712	1,679	76,315
60	0,076	0,073	0,010	0,010	0,124	0,119	96,320	91,874	1,605	1,531	94,097
75	0,099	0,101	0,014	0,014	0,168	0,172	130,402	133,366	1,739	1,778	131,884
110	0,122	0,121	0,018	0,018	0,212	0,211	164,484	163,003	1,495	1,482	163,744
120	0,123	0,122	0,018	0,018	0,214	0,212	165,966	164,484	1,383	1,371	165,225

Tabela A 8: Condições em que foi realizado o primeiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	1,323
V (tampão no reactor) (mL)	15
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,5
NOTA: As alíquotas retiradas ao longo do tempo foram diluídas 5 vezes em tampão	

Tabela A 9: Valores utilizados para o cálculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no primeiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
15	0,009	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,019	0,016	0,001	0,001	0,014	0,009	6,174	3,705	0,206	0,123	4,939
60	0,029	0,029	0,003	0,003	0,033	0,033	14,407	14,407	0,240	0,240	14,407
90	0,041	0,046	0,005	0,006	0,056	0,066	24,286	28,402	0,270	0,316	26,344
120	0,045	0,049	0,005	0,006	0,064	0,072	27,579	30,872	0,230	0,257	29,225

Tabela A 10: Condições em que foi realizado o segundo ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	0,721
V (tampão no reactor) (mL)	10
C (enzima) (mg/mL)	0,8
V (enzima no reactor) (mL)	0,25

Tabela A 11: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no segundo ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
15	0,008	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,012	0,012	0,000	0,000	0,001	0,000	0,050	0,000	0,002	0,000	0,025
60	0,018	0,014	0,001	0,000	0,012	0,004	0,655	0,252	0,011	0,004	0,453
90	0,021	0,019	0,002	0,001	0,017	0,013	0,957	0,755	0,011	0,008	0,856
120	0,023	0,028	0,002	0,003	0,020	0,029	1,158	1,662	0,010	0,014	1,410

Tabela A 12: Condições em que foi realizado o terceiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	0,661
V (tampão no reactor) (mL)	10
C (enzima) (mg/mL)	2
V (enzima no reactor) (mL)	0,25

Tabela A 13: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no terceiro ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
5,0	0,011	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7,5	0,015	0,013	0,001	0,000	0,006	0,003	0,353	0,151	0,047	0,020	0,252
15,0	0,020	0,017	0,001	0,001	0,015	0,010	0,856	0,554	0,057	0,037	0,705
30,0	0,027	0,025	0,002	0,002	0,027	0,024	1,561	1,360	0,052	0,045	1,460
45,0	0,033	0,035	0,003	0,004	0,038	0,042	2,165	2,367	0,048	0,053	2,266
60,0	0,036	0,037	0,004	0,004	0,043	0,045	2,468	2,568	0,041	0,043	2,518
75,0	0,036	0,038	0,004	0,004	0,043	0,047	2,468	2,669	0,033	0,036	2,568

Tabela A 14: Condições em que foi realizado o quarto ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	0,629
V (tampão no reactor) (mL)	10
C (enzima) (mg/mL)	4
V (enzima no reactor) (mL)	0,25

Tabela A 15: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no quarto ensaio de hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus*

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,013	0,018	0,000	0,001	0,003	0,012	0,151	0,655	0,030	0,131	0,403
8	0,033	0,035	0,003	0,004	0,038	0,042	2,165	2,367	0,289	0,316	2,266
15	0,040	0,041	0,005	0,005	0,050	0,052	2,870	2,971	0,191	0,198	2,921
30	0,052	0,055	0,006	0,007	0,072	0,077	4,079	4,381	0,136	0,146	4,230
45	0,060	0,058	0,008	0,007	0,086	0,082	4,885	4,683	0,109	0,104	4,784
60	0,060	0,059	0,008	0,008	0,086	0,084	4,885	4,784	0,081	0,080	4,834
75	0,062	0,059	0,008	0,008	0,089	0,084	5,086	4,784	0,068	0,064	4,935
90	0,062	0,060	0,008	0,008	0,089	0,086	5,086	4,885	0,057	0,054	4,985

Tabela A 16: Condições em que foi realizado o quinto ensaio (para as três pressões diferentes de processamento) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* que serve de controlo para a pasta tratada em alta pressão

T (°C)	40
Velocidade de agitação (rpm)	2000
m (substrato no reactor) (g)	0,662
V (tampão no reactor) (mL)	10
C (enzima) (mg/mL)	4
V (enzima no reactor) (mL)	0,25

Tabela A 17: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açucares redutores em equivalentes de glucose produzidos no quinto ensaio (mesmas condições da pasta processada a 200 MPa) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* que serve de controlo para a pasta tratada em alta pressão

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,007	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,014	0,015	0,000	0,001	0,005	0,007	0,302	0,403	0,020	0,027	0,353
30	0,018	0,017	0,001	0,001	0,012	0,011	0,705	0,604	0,024	0,020	0,655
45	0,019	0,019	0,001	0,001	0,014	0,014	0,806	0,806	0,018	0,018	0,806
60	0,020	0,020	0,001	0,001	0,016	0,016	0,906	0,906	0,015	0,015	0,906
75	0,022	0,021	0,002	0,002	0,019	0,018	1,108	1,007	0,015	0,013	1,058

Tabela A 18: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no quinto ensaio (mesmas condições da pasta processada a 300 MPa) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* que serve de controlo para a pasta tratada em alta pressão

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
5	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,006	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,013	0,016	0,000	0,001	0,004	0,009	0,201	0,504	0,013	0,034	0,353
30	0,017	0,016	0,001	0,001	0,011	0,009	0,604	0,504	0,020	0,017	0,554
45	0,020	0,023	0,001	0,002	0,016	0,021	0,906	1,209	0,020	0,027	1,058
60	0,024	0,025	0,002	0,002	0,023	0,025	1,309	1,410	0,022	0,024	1,360
75	0,027	0,026	0,003	0,002	0,028	0,027	1,611	1,511	0,021	0,020	1,561

Tabela A 19: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no quinto ensaio (mesmas condições da pasta processada a 400 MPa) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* que serve de controlo para a pasta tratada em alta pressão

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
5	0,002	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,005	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,012	0,013	0,000	0,000	0,002	0,004	0,101	0,201	0,007	0,013	0,151
30	0,015	0,014	0,001	0,000	0,007	0,005	0,403	0,302	0,013	0,010	0,353
45	0,016	0,016	0,001	0,001	0,009	0,009	0,504	0,504	0,011	0,011	0,504
60	0,020	0,019	0,001	0,001	0,016	0,014	0,906	0,806	0,015	0,013	0,856
75	0,021	0,020	0,002	0,001	0,018	0,016	1,007	0,906	0,013	0,012	0,957

NOTA: A quantidade de açúcares produzidos tomada como controlo diz respeito à média das três réplicas

Tabela A 20: Condições em que foi realizado o sexto ensaio (réplica 1 e 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 200 MPa

T (°C)		40
Velocidade de agitação (rpm)		2000
Réplica 1	m (substrato no reactor) (g)	0,668
Réplica 2		0,664
V (tampão no reactor) (mL)		10
C (enzima) (mg/mL)		4
V (enzima no reactor) (mL)		0,25

Tabela A 21: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açucars redutores em equivalentes de glucose produzidos no sexto ensaio (réplica 1) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 200 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
5	0,006	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,007	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,014	0,015	0,000	0,001	0,005	0,007	0,302	0,403	0,020	0,027	0,353
30	0,020	0,020	0,001	0,001	0,016	0,016	0,906	0,906	0,030	0,030	0,906
45	0,022	0,022	0,002	0,002	0,019	0,019	1,108	1,108	0,025	0,025	1,108
60	0,024	0,025	0,002	0,002	0,023	0,025	1,309	1,410	0,022	0,024	1,360
75	0,025	0,026	0,002	0,002	0,025	0,027	1,410	1,511	0,019	0,020	1,460

Tabela A 22: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no sexto ensaio (réplica 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 200 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μ mol)	n(Glc) _{reactor2} (μ mol)	Act _{reactor1} (μ mol/min)	Act _{reactor2} (μ mol/min)	média _{Glc} (μ mol)
5	0,005	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,009	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,014	0,015	0,000	0,001	0,005	0,007	0,302	0,403	0,020	0,027	0,353
30	0,021	0,020	0,002	0,001	0,018	0,016	1,007	0,906	0,034	0,030	0,957
45	0,023	0,022	0,002	0,002	0,021	0,019	1,209	1,108	0,027	0,025	1,158
60	0,024	0,024	0,002	0,002	0,023	0,023	1,309	1,309	0,022	0,022	1,309
75	0,026	0,025	0,002	0,002	0,027	0,025	1,511	1,410	0,020	0,019	1,460

NOTA: A quantidade de açúcares produzidos tomada em consideração neste ensaio diz respeito à média das duas réplicas

Tabela A 23: Condições em que foi realizado o sétimo ensaio (réplica 1 e 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 300 MPa

T (°C)		40
Velocidade de agitação (rpm)		2000
Réplica 1	m (substrato no reactor) (g)	0,697
Réplica 2		0,698
V (tampão no reactor) (mL)		10
C (enzima) (mg/mL)		4
V (enzima no reactor) (mL)		0,25

Tabela A 24: Valores utilizados para o cálculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no sétimo ensaio (réplica 1) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 300 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,011	0,013	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,151	0,000	0,020	0,076
15	0,020	0,019	0,001	0,001	0,015	0,013	0,856	0,755	0,057	0,050	0,806
30	0,024	0,026	0,002	0,002	0,022	0,026	1,259	1,460	0,042	0,049	1,360
45	0,031	0,032	0,003	0,003	0,035	0,036	1,964	2,065	0,044	0,046	2,014
60	0,033	0,032	0,003	0,003	0,038	0,036	2,165	2,065	0,036	0,034	2,115
75	0,033	0,033	0,003	0,003	0,038	0,038	2,165	2,165	0,029	0,029	2,165

Tabela A 25: Valores utilizados para o cálculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no sétimo ensaio (réplica 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 300 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,002	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,007	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,009	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,018	0,017	0,001	0,001	0,012	0,011	0,705	0,604	0,024	0,020	0,655
45	0,024	0,022	0,002	0,002	0,023	0,019	1,309	1,108	0,029	0,025	1,209
60	0,031	0,031	0,003	0,003	0,035	0,035	2,014	2,014	0,034	0,034	2,014
75	0,031	0,031	0,003	0,003	0,035	0,035	2,014	2,014	0,027	0,027	2,014

NOTA: A quantidade de açúcares produzidos tomada em consideração neste ensaio diz respeito à média das duas réplicas

Tabela A 26: Condições em que foi realizado o oitavo ensaio (réplica 1 e 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 300 MPa

T (°C)		40
Velocidade de agitação (rpm)		2000
Réplica 1	m (substrato no reactor) (g)	0,666
Réplica 2		
V (tampão no reactor) (mL)		10
C (enzima) (mg/mL)		4
V (enzima no reactor) (mL)		0,25

Tabela A 27: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açucres redutores em equivalentes de glucose produzidos no oitavo ensaio (réplica 1) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 300 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{fina11} (mg/ml)	[Glc] _{fina12} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
5	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,014	0,014	0,000	0,000	0,004	0,004	0,252	0,252	0,034	0,034	0,252
15	0,025	0,029	0,002	0,003	0,024	0,031	1,360	1,763	0,091	0,118	1,561
30	0,034	0,033	0,004	0,003	0,040	0,038	2,266	2,165	0,076	0,072	2,216
45	0,035	0,035	0,004	0,004	0,042	0,042	2,367	2,367	0,053	0,053	2,367
60	0,035	0,038	0,004	0,004	0,042	0,047	2,367	2,669	0,039	0,044	2,518
75	0,035	0,037	0,004	0,004	0,042	0,045	2,367	2,568	0,032	0,034	2,468

Tabela A 28: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no oitavo ensaio (réplica 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 300 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,015	0,014	0,001	0,000	0,007	0,005	0,403	0,302	0,081	0,060	0,353
8	0,018	0,018	0,001	0,001	0,012	0,012	0,705	0,705	0,094	0,094	0,705
15	0,031	0,032	0,003	0,003	0,035	0,037	2,014	2,115	0,134	0,141	2,065
30	0,038	0,037	0,004	0,004	0,048	0,046	2,719	2,619	0,091	0,087	2,669
45	0,040	0,040	0,005	0,005	0,051	0,051	2,921	2,921	0,065	0,065	2,921
60	0,040	0,041	0,005	0,005	0,051	0,053	2,921	3,021	0,049	0,050	2,971
75	0,042	0,041	0,005	0,005	0,055	0,053	3,122	3,021	0,042	0,040	3,072

NOTA: A quantidade de açúcares produzidos tomada em consideração neste ensaio diz respeito à média das duas réplicas

Tabela A 29: Condições em que foi realizado o nono ensaio (réplica 1 e 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 400 MPa

T (°C)		40
Velocidade de agitação (rpm)		2000
Réplica 1	m (substrato no reactor) (g)	0,695
Réplica 2		0,698
V (tampão no reactor) (mL)		10
C (enzima) (mg/mL)		4
V (enzima no reactor) (mL)		0,25

Tabela A 30: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no nono ensaio (réplica 1) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 400 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
5	0,010	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,018	0,019	0,001	0,001	0,012	0,014	0,705	0,806	0,094	0,107	0,755
15	0,022	0,023	0,002	0,002	0,019	0,021	1,108	1,209	0,074	0,081	1,158
30	0,030	0,029	0,003	0,003	0,034	0,032	1,914	1,813	0,064	0,060	1,863
45	0,030	0,031	0,003	0,003	0,034	0,035	1,914	2,014	0,043	0,045	1,964
60	0,035	0,035	0,004	0,004	0,042	0,042	2,417	2,417	0,040	0,040	2,417
75	0,037	0,036	0,004	0,004	0,046	0,044	2,619	2,518	0,035	0,034	2,568

Tabela A 31: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no nono ensaio (réplica 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 400 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (µmol)	n(Glc) _{reactor2} (µmol)	Act _{reactor1} (µmol/min)	Act _{reactor2} (µmol/min)	média _{Glc} (µmol)
5	0,011	0,012	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,050	0,000	0,010	0,025
8	0,019	0,018	0,001	0,001	0,013	0,012	0,755	0,655	0,101	0,087	0,705
15	0,025	0,026	0,002	0,002	0,024	0,026	1,360	1,460	0,091	0,097	1,410
30	0,031	0,031	0,003	0,003	0,035	0,035	1,964	1,964	0,065	0,065	1,964
45	0,033	0,032	0,003	0,003	0,038	0,036	2,165	2,065	0,048	0,046	2,115
60	0,035	0,037	0,004	0,004	0,042	0,045	2,367	2,568	0,039	0,043	2,468
75	0,037	0,038	0,004	0,004	0,045	0,047	2,568	2,669	0,034	0,036	2,619

NOTA: A quantidade de açúcares produzidos tomada em consideração neste ensaio diz respeito à média das duas réplicas

Tabela A 32: Condições em que foi realizado o décimo ensaio (réplica 1 e 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 400 MPa

T (°C)		40
Velocidade de agitação (rpm)		2000
Réplica 1	m (substrato no reactor) (g)	0,665
Réplica 2		0,667
V (tampão no reactor) (mL)		10
C (enzima) (mg/mL)		4
V (enzima no reactor) (mL)		0,25

Tabela A 33: Valores utilizados para o cálculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no décimo ensaio (réplica 1) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 400 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,008	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,020	0,019	0,001	0,001	0,015	0,013	0,856	0,755	0,114	0,101	0,806
15	0,022	0,023	0,002	0,002	0,019	0,020	1,058	1,158	0,071	0,077	1,108
30	0,027	0,029	0,002	0,003	0,027	0,031	1,561	1,763	0,052	0,059	1,662
45	0,032	0,033	0,003	0,003	0,036	0,038	2,065	2,165	0,046	0,048	2,115
60	0,035	0,034	0,004	0,004	0,042	0,040	2,367	2,266	0,039	0,038	2,316
75	0,036	0,035	0,004	0,004	0,043	0,042	2,468	2,367	0,033	0,032	2,417

Tabela A 34: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açúcares redutores em equivalentes de glucose produzidos no décimo ensaio (réplica 2) da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 45 min a 400 MPa

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,008	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,021	0,022	0,002	0,002	0,018	0,019	1,007	1,108	0,134	0,148	1,058
15	0,023	0,024	0,002	0,002	0,021	0,023	1,209	1,309	0,081	0,087	1,259
30	0,027	0,028	0,003	0,003	0,028	0,030	1,611	1,712	0,054	0,057	1,662
45	0,033	0,034	0,004	0,004	0,039	0,041	2,216	2,316	0,049	0,051	2,266
60	0,035	0,036	0,004	0,004	0,042	0,044	2,417	2,518	0,040	0,042	2,468
75	0,037	0,037	0,004	0,004	0,046	0,046	2,619	2,619	0,035	0,035	2,619

NOTA: A quantidade de açúcares produzidos tomada em consideração neste ensaio diz respeito à média das duas réplicas

Tabela A 35: Condições em que foi realizado o ensaio combinatório da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 400 MPa

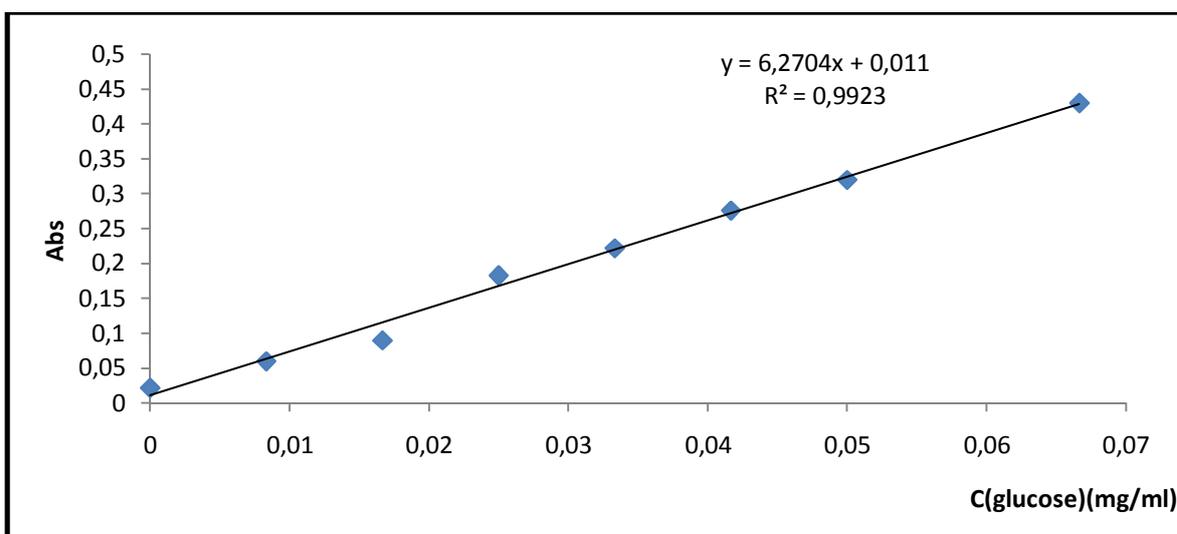
T (°C)		40
Velocidade de agitação (rpm)		2000
Reacção com xilanase	m (substrato no reactor) (g)	0,665
Reacção com celulase		0,160
Reacção com xilanase	V (tampão no reactor) (mL)	10,0
Reacção com celulase		6,8
Reacção com xilanase	C (enzima) (mg/mL)	4
Reacção com celulase		22,2
Reacção com xilanase	V (enzima no reactor) (mL)	0,25
Reacção com celulase		1,20

Tabela A 36: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açucars redutores em equivalentes de glucose produzidos na da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 400 MPa com xilanase

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,016	0,018	0,001	0,001	0,008	0,012	0,453	0,655	0,060	0,087	0,554
15,0	0,023	0,024	0,002	0,002	0,020	0,022	1,158	1,259	0,077	0,084	1,209
30,0	0,026	0,028	0,002	0,003	0,026	0,029	1,460	1,662	0,049	0,055	1,561
60,0	0,034	0,035	0,004	0,004	0,040	0,042	2,266	2,367	0,038	0,039	2,316

Tabela A 37: Valores utilizados para o calculo da quantidade de açucars redutores em equivalentes de glucose produzidos na da hidrólise enzimática da pasta kraft de *E. globulus* pré-tratada em alta pressão durante 15 min a 400 MPa com celulase

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,119	0,119	0,017	0,017	0,190	0,190	10,827	10,827	1,444	1,444	10,827
15,0	0,166	0,165	0,025	0,024	0,273	0,272	15,560	15,460	1,037	1,031	15,510
30,0	0,238	0,242	0,036	0,037	0,401	0,408	22,812	23,215	0,760	0,774	23,013
60,0	0,268	0,260	0,041	0,040	0,454	0,440	25,833	25,028	0,431	0,417	25,430

Anexo B: Gráficos auxiliares**Figura B 1:** Recta de calibração para a glucose

Anexo C: Metodologia de calculo

Os valores retirados das reacções de hidrólise dizem respeito à absorvâncias deste modo é necessário converter esse valor de absorvância numa quantidade que permita saber qual a porção de açúcares redutores que se encontra no reactor onde ocorreu a reacção de hidrólise.

1-Calculo da absorvância corrigida (Abs_{1cg}).

$$Abs_{1cg} = Abs(t = t_r) - Abs(t = 0) \quad (1.C)$$

2-Calculo através da equação da recta de calibração de glucose da concentração final de glucose ($[Glc]_{final1}$) que corresponde àquele valor de absorvância.

$$[Glc]_{final1} (mg/ml) = \frac{Abs_{1cg} - b}{m} \quad (2.C)$$

3-Calculo da massa de glucose ($m(Glc)_{tubos1}$) presente nos tubos aquando da realização do DNS.

$$m(Glc)_{tubos1} (mg) = [Glc]_{final1} \times (V_{aliquota \text{ retirada do reactor}} + V_{DNS} + V_{H_2O}) \quad (3.C)$$

4- Calculo do número de moles de glucose ($n(Glc)_{reactor1}$) presentes no reactor.

$$m(Glc)_{reactor1} (mg) = \frac{m(Glc)_{tubos1} \times V_{aliquota \text{ retirada do reactor}}}{V_{tubo}} \times (V_{tampão \text{ no reactor}} + V_{enzima \text{ no reactor}}) \quad (4.C)$$

$$n(Glc)_{reactor1} (\mu mol) = \frac{m(Glc)_{reactor1} \times 10^{-3}}{M(Glc)} \times 10^6 \quad (5.C)$$

5-Calculo da actividade ($Act_{reactor1}$)

$$Act_{reactor1} (\mu mol/min) = \frac{n(Glc)_{reactor1}}{t_r} \quad (6.C)$$