

# Melhoramento das propriedades de polpa não branqueada reciclada mediante sistema Lacase / Mediador

*Improvement of recycled unbleached pulp properties by Laccase/Mediator System*

**Autor:** Mocchiutti, Paulina<sup>a</sup>; Zanuttini, Miguel<sup>a</sup> e Saparrat, Mario C. N.<sup>b</sup>

**Palavras chave:** Sistema Lacase-Mediador; fibras recicladas; *Gramothele subargentea*, propriedades do papel

## RESUMO

A modificação específica ou a remoção de lignina de polpas de alto número kappa recicladas poderia ser uma alternativa para o melhoramento de suas propriedades papeleiras. Neste tipo de experimentos considerou-se a aplicação de enzimas ligninolíticas. Começou-se com uma polpa kraft virgem de pinheiro que foi refinada, secada e desintegrada, para depois ser classificada com vistas à obtenção da fração R30 como material de início. A enzima lacase isolada do fungo *Gramothele subargentea* na presença de HBT (1-hidroxi-benzotriazole) foi utilizada como mediador. Os tratamentos foram realizados em polpa com consistência de 2%, temperatura de  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  e pH 4,5 sob agitação e borbulhamento de oxigênio durante 4,5 horas. As polpas tratadas foram lavadas com uma solução de surfactante Tween 20 até que não fosse mais detectada atividade enzimática no filtrado. Por fim, foram aplicadas extrações alcalinas. Foram determinadas propriedades químicas como teor de retenção de água (WRV), grupos ácidos totais, número kappa e coeficiente de

## ABSTRACT

*The specific modification of the removing of lignin from recycled high-kappa number pulps could be an alternative for improving their paper-making properties. In this series of experiments the application of a ligninolytic enzyme was considered. Virgin softwood kraft pulp was refined, dried, repulped and classified to obtain the R30 fraction as starting material. A Gramothele subargentea laccase extract and HBT (1-Hydroxybenzotriazole) as a mediator was used. The treatments were carried out at 2% pulp consistency,  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  and pH 4,5 under stirring and oxygen bubbling for 4,5 h. The pulps treated were washed with a solution of Tween 20 surfactant until no enzymatic activity was detected on the filtrated solution. Chemical properties such as water retention value (WRV); total acid groups, kappa number and light absorption coefficient, and also physical properties such as tensile index, apparent density, and light scattering coefficient were determined. The results show that the mediator alone increased the handsheet density by 4,1% compared to the untreated pulp. The alkaline extraction subsequent to Laccase-Mediator Systems (LMS-AE) proved to be useful for the improvement of the bonding capacity of fibres. Tensile index was 11% compared to a simple alkaline treated pulp. The light absorption coefficient increases 5% indicating the oxidative action of the system.*

**Keywords:** Laccase-Mediator System, recycled fibres, *Gramothele subargentea*, papermaking properties.

absorção da luz, assim como as propriedades físicas de índice de tração, densidade aparente e coeficiente de dispersão da luz. Os resultados mostram que o mediador aumentou a densidade das folhas experimentais em cerca de 4,1% em comparação a folhas de polpa não tratada. O sistema Lacase-Mediador seguido de uma

extração alcalina (LMS-AE) comprovou ser efetivo para a melhoria do entrelaçamento das fibras. O índice de tração foi 11% maior em comparação ao das folhas de polpa com tratamento alcalino simples. O coeficiente de absorção da luz aumentou em cerca de 5%, atestando a ação oxidante do sistema.

## Referência:

- <sup>a</sup> Instituto de Tecnologia Celulósica, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé – Argentina  
<sup>b</sup> Instituto de Botánica Spegazzini, Universidad Nacional de La Plata, La Plata – Argentina

## INTRODUÇÃO

Do ponto de vista ambiental, polpa reciclada como fonte de fibras para a produção de papel ou cartão é de grande conveniência. Em algumas regiões a utilização de papel recuperado é também imposta por regulamentações locais. Contudo, resistência menor em comparação a polpa virgem correspondente é o impedimento para uma maior utilização de material reciclado. A perda em capacidade de ligação, que acontece quando as fibras são secadas, pode ser atribuída ao processo de ramificação que ocorre nas paredes da fibra, assim como à desativação da superfície das fibras (Nazhad e Pasner, 1994).

É notório que fibras secundárias podem ser melhoradas mediante refinação em baixa ou alta consistências (DeFoe, 1993), mas isto implica em aumento dos custos de processamento e em redução das propriedades de desaguamento das polpas.

Uma alternativa para o melhoramento da capacidade de ligação interfibras, e conseqüentemente aumento das propriedades para fabricação de papel sem diminuição da característica de desaguamento, poderia ser a aplicação de lacase fúngica em associação com compostos de baixo peso molecular, os assim definidos mediadores. Trabalhos anteriores têm demonstrado que o Sistema-Lacase-Mediador (LMS) é um sistema eficiente para desmetilação e branqueamento de polpas kraft (Paice *et al.*, 1995; Sealey e Ragauskas, 2000), e é também eficiente para o melhoramento da resistência a úmido de polpas kraft não branqueadas (Lund e Felby, 2001). Contudo, até onde nos foi possível saber, não há informações prévias quanto à ação do LMS nas propriedades físicas e químicas de fibras não branqueadas recicladas.

Chakar *et al.* (2000) e Paice *et al.* (1995) constataram que quando a enzima lacase é utilizada na presença do mediador HBT (1-hidroxibenzotriazole) e oxigênio em polpas kraft com baixo teor de lignina pode

ocorrer a formação de aldeídos, quinonas e grupos ácidos carboxílicos a partir de estruturas fenólica e não-fenólica da lignina. Seria de se esperar que o efeito inibidor da lignina hidrofóbica tenderia a diminuir e a ligação interfibras poderia portanto aumentar.

Até o presente, a implementação deste processo enzimático tem sido freada pelo alto custo do HBT. Contudo, e com empenho, tem sido iniciadas pesquisas no sentido do desenvolvimento de mediadores alternativos (Chakar e Ragauskas, 2000; Bourbonnais *et al.*, 1997).

No presente trabalho foi analisado o efeito do LMS e do mediador isoladamente sobre as polpas. Fibras kraft não branqueadas recicladas foram tratadas com um extrato de lacase *Grammothele subargentea* em presença de HBT e oxigênio, e feita extração alcalina em seguida. Foram avaliadas propriedades como teor de retenção de água (WRV), total de grupos ácidos e número kappa; as propriedades físicas de índice de tração e de densidade aparente; e também as propriedades ópticas de coeficientes de absorção e de espalhamento da luz.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais para início da experiência

Foram utilizadas fibras recicladas de polpa kraft de coníferas não branqueada. Polpa kraft virgem de coníferas - número kappa 85,0 e grau de drenabilidade Canadian Standard Freeness (CSF) de 810 mL, fornecida pela Papel Misionero S.A., Argentina, na forma de manta seca -, foi deixada impregnando durante 72 horas, desagregada durante 5 minutos em desagregador de laboratório British e refinada com 20 mil rotações em dois estágios de baixa carga de refino, com moinho PFI (Tappi T248 cm-85), de onde resultou drenabilidade CSF final de 640 mL. Foram formadas folhas de laboratório segundo padrão SCAN-C 26:76, exceto a folha que apresentou gramatura de 214 g/m<sup>2</sup>. As folhas foram secadas sob condições padrão

(SCAN-P 2:75), mas, para que fosse assegurada secagem sob tensão, foram colocados discos sobre as folhas e depois posto um grande peso sobre a pilha de discos, procedimento semelhante ao do método Tappi T205 sp-95. As folhas permaneceram em impregnação durante toda a noite e depois desagregadas por cinco minutos. A polpa obtida foi classificada em classificador Bauer-McNett conforme SCAN-M 6:69. Foi coletada somente a fração R30. Para a eliminação dos íons metálicos esta fração de polpa, com consistência de 4% (4 g de polpa seca / 100 g de suspensão), foi tratada durante 45 minutos com HCl 0,1N, e depois lavada com água destilada até que o pH se situasse entre 4,0 e 5,0. A polpa foi armazenada em ambiente com 4°C até sua utilização.

### Preparação de extrato bruto de *G subargentea* com atividade lacase

Nestes experimentos foi utilizada a cepa CLPS (coleção de culturas do Instituto Spegazzini da Universidade Nacional de La Plata) n.º 436 de *Grammothele subargentea* (Speg.) Rajch. Esta cepa foi isolada de estrutura fúngica portadora de esporos, coletada de tronco de árvore angiosperma de crescimento em floresta úmida de área subtropical da província de Misiones, Argentina. O estoque de culturas era mantido em extrato de malte derivado de ágar suplementado com extrato de levedura (0,4%), e cavacos de madeira *Populus spp.*, em temperatura de 4°C.

Foi inoculada uma suspensão micelial (1% v v<sup>-1</sup>) em frascos Erlenmeyer, cada um contendo 200 mL de meio de cultura líquido Czapek Dox modificado suplementado com 0,6 mM de CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, como descrito em Sapparat *et al.* (2002 b, 2004). As culturas foram desenvolvidas em ambiente a 25 ± 1,5°C. Depois de 20 dias de cultivo os micélios foram retirados do líquido de cultura mediante centrifugação a 20 mil x g por 10 minutos e temperatura de 4°C; a camada sobrenadante resultante era coletada para aplicação no tratamento das polpas.

## Ensaio com enzimas

A atividade lacase foi determinada de modo semelhante ao que consta em Guillén *et al.*, 1992. Em células de 1 mL, a mistura de ensaio continha: 400 µL de guaiacol 25 mM; 200 µL de solução tampão HAc/NaAc 160 mM (pH = 4,5); 200 µL de extrato lacase (E) e 200 µL de água destilada. O nível de absorvência do produto da oxidação do guaiacol via lacase ( $\epsilon_{465} = 12.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi medido em 465 nm com espectrofotômetro ReflectaScan CE 3055. Uma unidade de atividade lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a conversão de 1 µmol de subtração de guaiacol por minuto. O nível de atividade da lacase em extrato bruto foi de 568 mU/mL.

## TRATAMENTOS

O tratamento enzimático foi realizado com polpa a 2% de consistência, temperatura  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  e pH de 4,5 (ajustado com tampão acetato de sódio, 55 mM) sob agitação e borbulhamento de oxigênio durante 4,5 horas.

O extrato de lacase foi adicionado a uma solução do mediador HBT (1-hidroxibenzotriazole, monohidrato) da ICN Biomedicals e imediatamente misturado na suspensão de polpa. A carga de HBT foi de 3% sobre a polpa seca. A cada 20 minutos eram testados 600 µL da suspensão para o controle da atividade da lacase. Quando necessário, eram adicionadas mais enzimas de modo a ser mantido o nível de atividades. Foi adicionado um total de 1.031 mU de enzima por g de polpa seca.

Foram feitos controles do tratamento (sem adição de enzima ou de HBT) e do tratamento com somente HBT.

Depois dos tratamentos, as polpas eram tratadas com uma solução a 0,1% de Tween 20, de fornecimento Anedra, sob agitação contínua, durante 30 minutos. A lavagem era repetida até que não fosse mais detectada atividade enzimática na solução filtrada.

Foram feitas extrações alcalinas (AE) com polpa a 7% de consistência,

temperatura de  $70 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 1,5 hora, utilizando 2% de NaOH sobre massa seca.

## Identificação dos ensaios

E-H-T-AE: tratamento com extrato de lacase e HBT, lavagem com Tween 20 e posterior extração alcalina.

H-T: tratamento com somente HBT e lavagem com Tween 20.

H-T-AE: tratamento com HBT, lavagem com Tween 20 e extração alcalina.

C-T: polpa de controle. Tratada com as mesmas condições de tratamento aplicadas à polpa LMS (E-H-T-AE), com a diferença de que não foram adicionados lacase e mediador.

C-T-AE: polpa de controle, com extração alcalina.

Foram determinadas as seguintes características químicas da polpa: número kappa (Tappi T236 cm-85), total de grupos ácidos (Katz *et al.*, 1984; Lloyds e Horne, 1993), e WRV (teor de retenção de água).

As folhas de laboratório, com gramatura de 60 g/m<sup>2</sup>, foram preparadas segundo o método SCAN. Nestas folhas foram determinadas as propriedades de: índice de tração (Tappi T494 om-88), densidade aparente (Tappi T410 om-93 e T411 om-89) e também o coeficiente de espalhamento da luz (SCAN-C 27:69, com utilização do filtro R68 cujo comprimento efetivo de onda é de 681 nm). Foi ainda determi-

nado o coeficiente de absorção de luz a 681 nm em conformidade com a teoria de Kobelka-Munk (Leskela M., 1998).

## Teor de Retenção de Água método cálcio (WRV-Ca)

Um grama de polpa seca foi convertido em suspensão com consistência de 2,5%. O pH foi ajustado em 7,0 utilizando NaOH a 0,1%. Na seqüência, foi adicionado 1,3 mL de CaCl<sub>2</sub> a 0,5% e a suspensão de polpa foi deixada nestas condições durante 15 minutos para sua conversão na forma de cálcio. O pH foi novamente ajustado para neutro utilizando Ca(OH)<sub>2</sub> a 0,18%. A polpa foi centrifugada a 3 mil x g por 30 minutos. Esta polpa úmida foi pesada e secada a 105°C até peso constante.

$$\text{WRV-Ca} = (\text{peso da polpa úmida} - \text{peso da polpa seca}) / \text{peso da polpa seca}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Propriedades químicas

A Figura 1 mostra o teor de retenção de água (WRV) como função do Total de Grupos Ácidos. Ambas as propriedades aumentaram devido, principalmente, à ação alcalina subsequente aos diferentes tratamentos enzimáticos. Como já constatado por outros autores (Freeland e Hrutfiord, 1994), o tratamento alcalino claramente aumenta o inchamento das fibras. Do tratamento alcalino podem

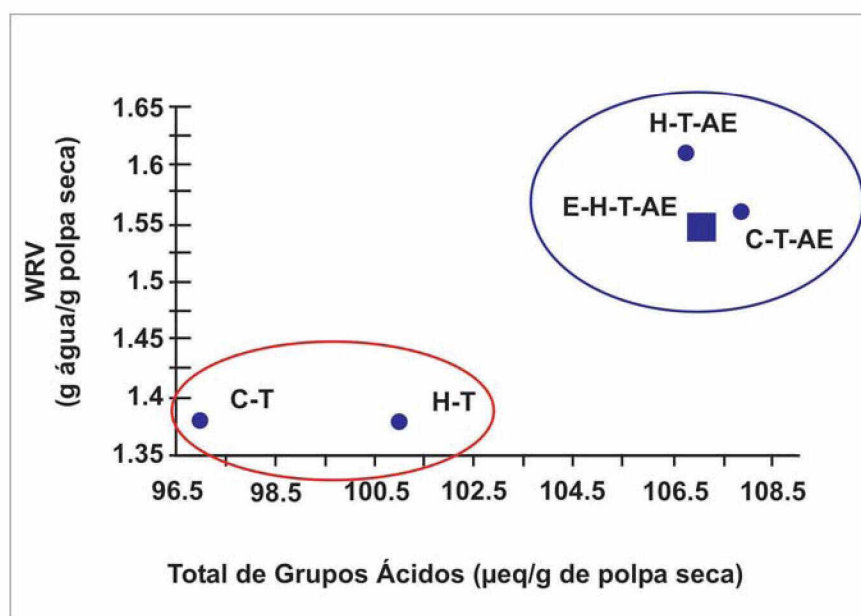


Figura 1 - Teor de Retenção de Água vs Total de Grupos Ácidos

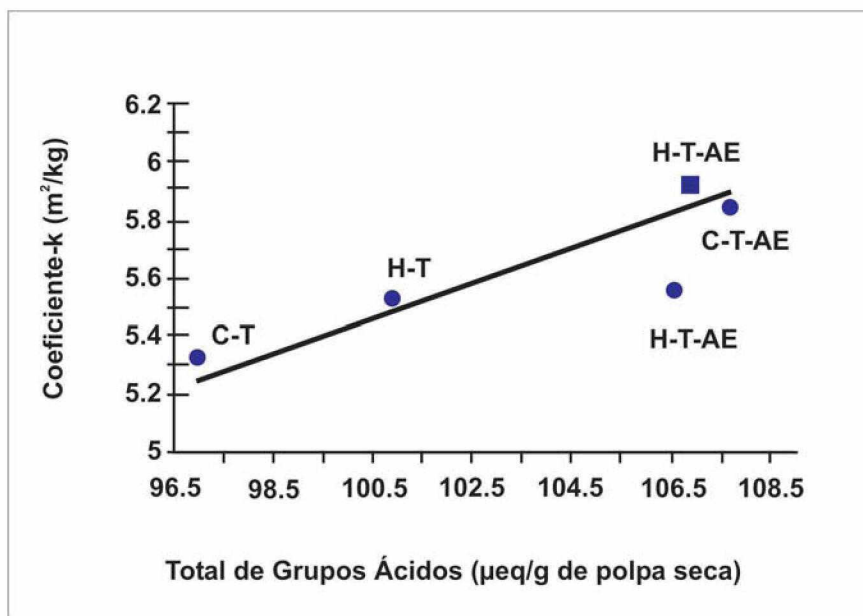


Figura 2 - Coeficiente-k vs Total de Grupos Ácidos

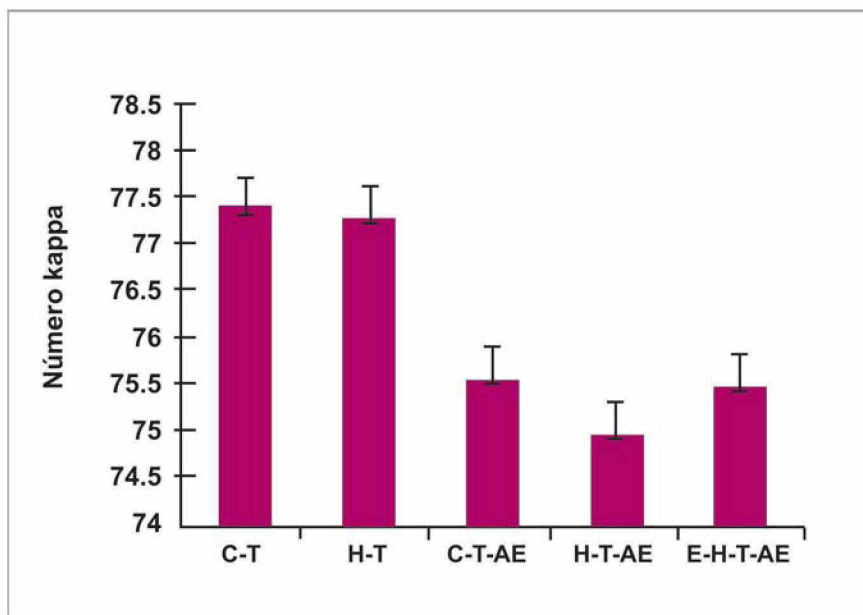


Figura 3 - Número kappa (desvio padrão médio = 0,3 é indicado na figura)

ser esperados efeitos benéficos para as propriedades do papel.

A Figura 2 mostra o coeficiente-k, que pode ser relacionado ao conteúdo de cromóforos, como função do Total de Grupos Ácidos. Mesmo com o aumento do coeficiente-k causado pela extração alcalina na polpa com tratamento C-T-AE, a ação do LMS seguido de extração alcalina (E-H-T-AE) o aumentou ainda mais, estando a indicar maior efeito oxidante. Chakar *et al.*, 2000, observaram este efeito de enegrecimento em polpas não branqueadas tratadas por sistema LMS-AE quando eram utilizados la-

case originada de *Trametes villosa* e mediador HBT.

A Figura 3 mostra que o número kappa foi reduzido principalmente devido à ação alcalina, ainda que o grau de redução não seja particularmente significativo em polpas não branqueadas. Wong K. *et al.*, 1999, detectaram o mesmo comportamento quando uma polpa não branqueada tratada com sistema LMS foi submetida a extração por peróxido. O número kappa do tratamento C-T comparado ao do H-T e também o número kappa do tratamento C-T-AE comparado ao do H-T-AE, estão a indicar que o me-

diador, por si só, não reduz a lignina na polpa. Outros autores observaram este comportamento em polpas kraft não branqueadas quando foram utilizados HBT ou NHAA (N-Acetil-N-Fenilhidroxilamina) - (Chakar e Ragauskas, 2000).

As figuras 4 e 5 indicam que o tratamento com HBT (H-T) aumentou a densidade das folhas de laboratório e reduziu o coeficiente de espalhamento da luz. Wong, K. *et al.*, 1999, atribuíram o adensamento da polpa kraft não branqueada causado pela aplicação de HBT a modificação na ligação por ponte de hidrogênio, interações iônicas ou hidrofóbicas inter e/ou intrafibras de celulose.

A extração alcalina subsequente à ação dos Sistemas Lacase-Mediador (LMS-AE) mostrou-se útil para o melhoramento da capacidade de ligação das fibras. O índice de tração foi 11% maior em comparação a polpa com tratamento alcalino simples e 5,8% mais alto em comparação a polpa processada com somente HBT e tratamento alcalino em seguida. É possível que a quinona e/ou os grupos ácidos gerados nas estruturas fenólicas e não-fenólicas da lignina tenham feito a lignina mais hidrofílica e que, portanto, a capacidade de ligação das fibras tenha aumentado.

## CONCLUSÕES

As principais conclusões quanto ao comportamento do LMS em polpas kraft não branqueadas recicladas quando é utilizado um extrato lacase de *G. subargentea* ou o mediador apenas, incluem:

- O tratamento das fibras com 3% (base polpa seca) de mediador HBT aumentou a densidade das folhas de laboratório de fibras não branqueadas recicladas em 4,1%.

- O tratamento com LMS seguido de extração alcalina (LMS-AE) aumentou o coeficiente de absorção de luz mais do que fez um tratamento alcalino simples, indicando que o LMS produziu oxidações químicas.

- O índice de tração foi aumentado em 11,1% e o coeficiente de espalhamento da luz foi diminuído em

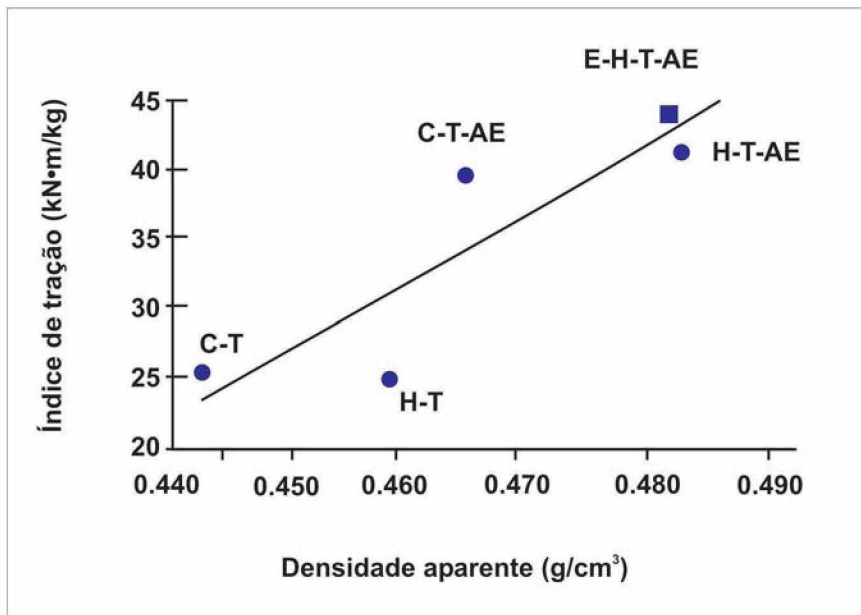


Figura 4 - Índice de tração vs densidade aparente

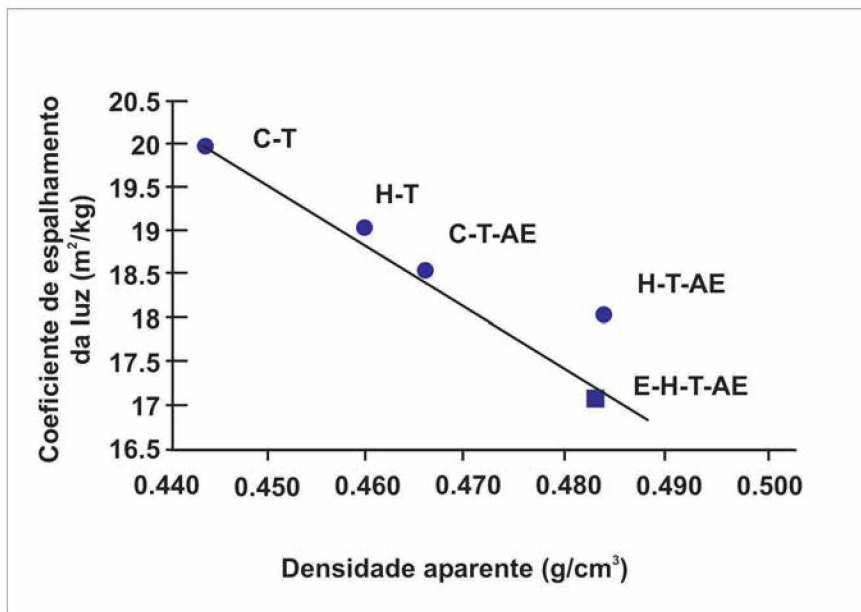


Figura 5 - Espalhamento da luz vs densidade aparente

8% pela ação do tratamento MLS-AE, em comparação a tratamento alcalino simples.

Pelo fato de o LMS ser específico para lignina, trabalhos futuros deveriam se propor o exame de mudanças químicas na lignina residual, para que se possa conhecer a sua função na capacidade de ligação destas fibras kraft não branqueadas recicladas.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Antorchas Proy. N°14188-64; à Agencia Nacional de Promoción Ci-

entífica e Tecnológica (ANPCyT), Proy. 14-06962 BID 1201/OC-AR e à CONICET, pelo suporte financeiro.

P. Mocchiutti e M.C.N. Saparrat são beneficiários de bolsa de estudos da CONICET.

M.A Zanuttini é pesquisador da CONICET.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E. and Borneman, S. (1997) "Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds". Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 4627- 4632.

Chakar, F.S. and Ragauskas, A.J. (2000) "The Kismet of Residual Lignins During LMS Delignification of High-Kappa Kraft Pulps". Holzforschung, vol. 54, N°6, p. 647-653.

DeFoe, R. J. (1993) "Optimal refining conditions for development of OCC pulp properties". Tappi Journal, vol. 76, N°2, p. 157-162.

Freeland S.A. and Hrutford, B.F. (1994) "Caustic treatment of OCC for strength improvement during recycling". Tappi Journal, vol. 77, N°4, p.185-191.

Guillén, F., Martínez, A. T. And Martínez, M.J. (1992) "Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from ligninolytic fungus Pleurotus eryngii". Eur J. Biochem, vol. 209, p. 603-611.

Katz, S; Beatson, R. and Scallan, A. (1984) "The determination of strong and weak acidic groups in sulfite pulps" Svensk papperstidning, N°6, R48-R53.

Leskelä M. (1998) "Optical properties". Chapter 4. In: Paper Physics. Book 16, Papermaking Science and Technology Series. Fapet Oy, editor. Helsinki, Finland, p. 120-122.

Lloyd, J.A. and Horne, C.W. (1993) "The determination of fibre charge and acidic groups of radiata pine pulps". Nordic Pulp and Paper Research J., N°1, p. 48-52 and 67.

Lund, M. and Felby, C. (2001) "Wet strength improvement of unbleached kraft pulp through laccase catalyzed oxidation" Enzyme and Microbial Technology, vol. 28, p. 760-765.

Nazhad, M, M, and Paszner, L. (1994) "Fundamentals of strength loss in recycled paper" Tappi Journal, vol. 7, N° 9, p.171- 179.

Paice, M.G., Bourbonnais, R. and Reid, I.D. (1995) "Bleaching kraft pulps with oxidative enzymes and alkaline hydrogen peroxide" Tappi Journal, vol. 78, N° 9, p.161-169.

Saparrat, M. C. N., Martínez, M. J., Cabello, M.N. and Arambarri, A. M. (2002 b) "Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strain from Argentina isolated from different substrata". Revista Iberoamericana de Micología, vol. 19, p.181-185.

Saparrat, M. C. N. Optimizing production of extracellular laccase from Gramothete subargentea CLPS no. 436 strain. World J Microbiol Biotechnol 2004 (in press).

SCAN TEST METHODS: 1975 SCAN-P 2:75; 1969 SCAN-M6:69; 1969 SCAN-C 27:69; 1976 SCAN-C 26:76.

Sealey, J. and Ragauskas, A. J. (1998) "Residual lignin studies of laccase-delignified kraft pulps" Enzyme and Microbial Technology, vol. 23, p. 422-426.

TAPPI Test methods 1996-1997. Atlanta, GA: T248 cm-85, T205 sp-95, T236 cm-85, T494 om-88, T410 om-93, T411 om-89.

Wong, K.; Anderson, K. and Kibblewhite, R. (1999) "Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps". Enzyme and Microb. Tech., vol. 25, p. 125-131.