

**Lacase no biobranqueamento de pasta kraft: pré-tratamento em condições alcalinas e temperatura elevada**

MFN -3011

N CHAMADA:

TITULO: Lacase no biobranqueamento de pasta kraft:  
pré-tratamento em condições alcalinas e temperatura elevada  
AUTOR(ES): Monteiro, M.C.Sant'Anna J., G.L.Carvalho, M.E.A.  
EDICAO:  
IDIOMA: português  
ASSUNTO: 02.3. Branqueamento da Pasta Celulósica  
TIPO: Congresso

EVENTO: Congresso Anual de Celulose e Papel, 31  
PROMOTOR: ABTCP  
CIDADE: São Paulo  
DATA: 19-23.10.1998  
IMPRESSÃO: 1998, ABTCP  
PAG/VOLUME: p.179-194,  
FONTE: Congresso Anual de Celulose e Papel, 31, 1998, São Paulo, p.179-194  
AUTOR ENTIDADE: Faculdade de Engenharia Química de Lorena COPPE Universidade Federal do Rio de Janeiro  
DESCRITOR:

RESUMO:

## Lacase no bi branqueamento de pasta Kraft: pré-tratamento em condições alcalinas e temperatura elevada\*

Milva C. Monteiro<sup>1,2</sup>; Geraldo L. Sant'Anna Junior<sup>2</sup> e Maria Eleonora A. de Carvalho<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Caixa Postal 116, CEP 12600-000, Lorena, SP

<sup>2</sup>COPPE, <sup>3</sup>Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68502, CEP 21946-970, Rio de Janeiro, RJ.

### RESUMO

A enzima lacase foi produzida pelo fungo *Trametes versicolor* em duas condições de pH. Após os testes de estabilidade da atividade enzimática à temperatura elevada e ao pH alcalino, as enzimas foram utilizadas em ensaios de bi branqueamento. O tratamento enzimático foi realizado em duas condições de temperatura (30°C e 55°C) e em pHs 5,0; 6,5; 7,0 e 8,0 seguido por uma extração alcalina convencional e por duas sequências ECF de branqueamento químico (DEDED ou DEpDED).

O bi branqueamento foi avaliado quanto a deslignificação, redução da viscosidade, alvura e consumo de ClO<sub>2</sub>. Foram obtidas alvuras superiores aos controles, as viscosidades foram preservadas e o tratamento enzimático resultou numa economia de 7% da carga total de ClO<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** lacase, pré-tratamento enzimático, deslignificação, viscosidade, alvura e economia de ClO<sub>2</sub>

### INTRODUÇÃO

O setor de celulose e papel é hoje um dos mais prósperos da indústria brasileira. Com esse intenso desenvolvimento, o setor vem buscando novos processos que garantam produtos de qualidade, mais competitivos e menos poluentes.

O branqueamento da celulose por agentes clorados resulta na formação grandes quantidades de compostos organoclorados. Os efluentes gerados nas etapas iniciais de branqueamento - cloração, dioxidação e extração alcalina - são os principais responsáveis pela cor final do efluente. Para reduzir ou eliminar o uso de derivados do cloro no branqueamento, novas tecnologias estão em desenvolvimento, tanto na área de deslignificação quanto na de branqueamento, onde a utilização de ozônio (1-5), peróxido de hidrogênio (6, 7), peróxido pressurizado (8, 9), quelantes (10), assim como de enzimas específicas (11, 12-17) têm sido alvo de muitos estudos.

As enzimas de interesse para a indústria de celulose e papel são ou as enzimas degradadoras de complexos lignina-carboidrato, como a xilanase, ou as enzimas capazes de degradar ou modificar a lignina, como a Lignina Peroxidase (LIP), Manganês Peroxidase (MNP) e a Lacase. Alguns microrganismos são capazes de produzir em determinadas condições de cultivo, as três enzimas envolvidas na degradação da lignina, esses microrganismos são, geralmente, fungos da podridão branca (*white-rot fungi*), tais como *Phanerochaete chrisosporium*, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Phlebia tremelosa* entre outros.

A enzima lacase, conhecida por oxidar compostos modelo de lignina, despolimerizar soluções aquosas de lignina e oxidar lignina Kraft, é uma proteína extracelular produzida em abundância pelo fungo *Trametes versicolor*. Estudos sobre a aplicação da enzima como uma etapa de pré-branqueamento revelaram que a lacase eleva a alvura das pastas tratadas além de contribuir para a redução do número kappa e melhorar algumas propriedades das pastas (18-21).

\* " Trabalho apresentado no 31º Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP, realizado em São Paulo - SP - Brasil, de 19 a 23 de outubro de 1998."

Alguns fatores dificultam a aplicação de enzimas no branqueamento industrial. Dentre eles, os mais importantes são: o volume requerido de enzima - dada a produção diária de pasta celulósica; as condições de temperatura e pH da pasta celulósica no ponto de aplicação da enzima - uma vez que as enzimas fúngicas atuam normalmente na temperatura de 30°C a 40°C e em pH de 3.0 a 5.0; e a presença de enzimas celulolíticas na preparação enzimática - prejudiciais à viscosidade da pasta celulósica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atuação da enzima lacase em pré-tratamentos de pastas celulósicas utilizando diferentes condições de pH e temperatura. Foi avaliada, também, a atuação dessas enzimas em pré-tratamentos enzimáticos associados às sequências DEDED e DEpDED de branqueamento químico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Produção de Lacase*

A enzima lacase foi produzida pelo fungo *Trametes versicolor* (ATCC 20869) em duas condições de pH, sendo denominada lacase A a enzima produzida em pH 5,0 e lacase B a enzima produzida em pH 6,5. As condições para a produção das enzimas foram previamente determinadas por Monteiro & Carvalho (22).

### *Atividades Enzimáticas*

A atividade lacase foi determinada como proposto por Szklarz *et al.*(23) usando seringaldazina como substrato. A reação é baseada na oxidação da seringaldazina a sua forma quinona e foi monitorada pela variação da absorbância a 525 nm ( $\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), durante um minuto. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a enzima necessária para oxidar um micromol de substrato por minuto. A atividade endo-glucanase foi determinada de acordo com Mandels *et al.* (24) usando carboximetil celulose (CMC) como substrato. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a enzima necessária para produzir um micromol de açúcar redutor por minuto.

### *Biobranqueamento da Pasta Celulósica 1 (P<sub>1</sub>)*

**Enzima Lacase.** Nesta primeira parte do biobranqueamento foi utilizada a enzima lacase A.

**Pasta Celulósica P<sub>1</sub>.** A polpa industrial Kraft de eucalipto utilizada nos experimentos apresentou as características listadas na Tabela I.

**Pré-tratamento Enzimático.** Os tratamentos enzimáticos foram realizados em escala de bancada, sob as condições descritas na Tabela II. Os ensaios foram conduzidos em sacos de polietileno mantidos, em banho termostático, na temperatura e no intervalo de tempo desejados. Após a adição dos reagentes e da enzima, a polpa foi homogeneizada e a reação foi conduzida sem agitação. O pré-tratamento enzimático foi seguido por uma extração alcalina convencional a 65°C por 1 hora usando 2,0% de NaOH e por uma sequência de branqueamento químico. Após cada estágio, enzimático ou de branqueamento químico, a polpa foi filtrada em funil de buchner e lavada com água destilada.

**Branqueamento Químico.** O branqueamento químico foi conduzido em sacos de polietileno, de forma semelhante ao pré-tratamento enzimático e, nas condições descritas na Tabela III.

### *Biobranqueamento da Pasta Celulósica 2 (P<sub>2</sub>)*

**Enzima.** Foram utilizadas as enzimas lacase A e lacase B.

**Pasta Celulósica P<sub>2</sub>.** A pasta Kraft utilizada nesta etapa apresentou as características listadas na Tabela IV.

**Pré-tratamento Enzimático.** Os tratamentos enzimáticos foram realizados como descrito anteriormente. As condições gerais são descritas na Tabela V.

**Branqueamento Químico.** No branqueamento químico foram utilizadas as sequências listadas na Tabela VI.

## Controles

Os controles de branqueamento químico CEDED e DEDED da pasta celulósica 1 (P<sub>1</sub>) foram branqueados de acordo com a tabela III. Os controles de branqueamento químico DEDED e DEpDED da pasta celulósica 2 (P<sub>2</sub>) foram branqueados de acordo com a tabela VI. Os controles de biobranqueamento EDEDED e EDEpDED foram submetidos a um estágio de extração alcalina seguido de branqueamento químico, enquanto que, os controles de biobranqueamento \*EDEDED e \*EDEpDED foram pré-tratados de acordo com a Tabela V (sem enzima) seguido de branqueamento químico.

## Avaliação dos Tratamentos

As determinações de Número Kappa, viscosidade, alvura e reversão da alvura foram realizadas conforme os métodos TAPPI.

Tabela I: Características da pasta Kraft P<sub>1</sub>

Características	Pasta Celulósica P <sub>1</sub>
Espécie de Madeira	85% <i>E. saligna</i> ; 15% <i>E. grandis</i>
Tipo de Lavagem	filtros lavadores
Número Kappa	13,7
Viscosidade (dm <sup>3</sup> /Kg)	1057,1
Alvura (%ISO)	35,4

Tabela II: Condições de pré-tratamento enzimático<sup>1</sup>

Etapa Enzimática		
Condições	Lacase A <sup>2</sup>	
Tratamento	La	Lb
Temperatura (°C)	30	55
Consistência (%)	10	10
Tempo de reação (h)	1	1
pH	5	8
Lacase (U/g pasta seca)	2	2
Extração Alcalina		
2,0% NaOH / 65°C / 1h / 10% consistência		

<sup>1</sup>As condições de pré-tratamento foram previamente determinadas por Monteiro & Carvalho (25).

<sup>2</sup>Produzida em pH 5,0.

Tabela III: Condições gerais utilizadas no branqueamento químico

Sequências de branqueamento	Condições de Branqueamento						
	Cl <sub>2</sub> (%)	ClO <sub>2</sub> (%)	NaOH (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Consistência (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
<b>C</b>	3,0				3	30	30
<b>E</b>			2,0		10	65	60
<b>D</b>		0,4			10	70	120
<b>E</b>			2,0		10	65	60
<b>D</b>		0,4			10	70	120
<b>D</b>		1,0			6	70	180
<b>E</b>			2,0		10	65	60
<b>D</b>		0,4			10	70	120
<b>E</b>			2,0		10	65	60
<b>D</b>		0,4			10	70	120
<b>D</b>		1,0			6	70	180
<b>Ep</b>			2,0	0,5	10	65	60
<b>D</b>		1,0			10	70	120
<b>E</b>			2,0		10	65	60
<b>D</b>		0,4			10	70	120

Tabela IV: Características pasta Kraft P<sub>2</sub>

Características	Pasta Celulósica P <sub>2</sub>
Espécie de Madeira	85% <i>E. grandis</i> ; 15% <i>E. urophylla</i>
Tipo de Lavagem	difusores
Número Kappa	15,5
Viscosidade (dm <sup>3</sup> /Kg)	1210
Alvura (%ISO)	36,4

Tabela V: Condições de pré-tratamento enzimático

Etapa Enzimática				
Condições	Lacase A <sup>1</sup>		Lacase B <sup>2</sup>	
	La	Lb	Lc	Ld
Tratamento				
Temperatura (°C)	30	55	30	55
Consistência (%)	10	10	10	10
Tempo de reação (h)	1	1	1	1
pH	5	8	6,5	7
Lacase (U/g pasta seca)	2	2	2	2
Extração Alcalina				
2,0% NaOH / 65°C / 1h / 10% consistência				
<sup>1</sup> Produzida em pH 5,0. <sup>2</sup> Produzida em pH 6,5.				

Tabela VI: Condições utilizadas na segunda parte do branqueamento químico

Sequências de branqueamento	Condições de Branqueamento					
	ClO <sub>2</sub> (%)	NaOH (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Consistência (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
<b>D</b>	0,65			6	70	180
<b>E</b>		2,0		10	65	60
<b>D</b>	0,40			10	70	120
<b>E</b>		2,0		10	65	60
<b>D</b>	0,40			10	70	120
<b>D</b>	0,65			6	70	180
<b>Ep</b>		2,0	0,50	10	65	60
<b>D</b>	0,40			10	70	120
<b>E</b>		2,0		10	65	60
<b>D</b>	0,40			10	70	120

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima lacase A produzida em pH 5,0 e a lacase B produzida em pH 6,5 foram avaliadas quanto à capacidade de atuar em temperaturas mais elevadas (55°C a 65°C) e em pH na faixa de 5,0 a 8,0 (congresso tenesse). Os melhores resultados quanto à estabilidade à temperatura e ao pH foram observados em amostras de lacase A à 55°C e pH 8,0 e em amostras de lacase B à 55° e pH 7,0, sendo estas as condições empregadas nos ensaios de bibranqueamento.

Os ensaios de bibranqueamento foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa foi utilizada uma amostra de pasta Kraft P<sub>1</sub> (Tabela I), a qual foi submetida a um tratamento enzimático com a enzima lacase A em duas condições 30°C/pH 5,0 e 55°C/pH 8,0 (Tabela II). Após o tratamento enzimático foi realizada uma extração alcalina e o branqueamento químico nas condições descritas na Tabela III.

Na segunda etapa, utilizou-se a pasta Kraft P<sub>2</sub> (Tabela IV) que foi enzimaticamente tratada com as enzimas lacase A e B, conforme Tabela V e, branqueada utilizando-se as sequências de branqueamento químico listadas na Tabela VI.

### Bibranqueamento da Pasta Celulósica 1 (P<sub>1</sub>)

Na Figura 1 é apresentado o perfil de deslignificação da pasta celulósica P<sub>1</sub> durante o bibranqueamento com a enzima lacase A. Observa-se que a enzima lacase A atuando no seu pH e temperatura ideais (30°C/pH 5,0) apresentou uma deslignificação real de 12,4% após o pré-



branqueamento enzimático (La) e de 13,1% quando associada a uma extração alcalina. A extração alcalina foi responsável, neste caso, por apenas 0,7% da deslignificação total.

Quando o pré-branqueamento com lacase A foi realizado em condições de pH e temperatura compatíveis com as industriais, ou seja, a 55°C/pH 8,0 (Lb), a deslignificação inicial foi menor do que a obtida com as amostras tratadas com a etapa La. Essa menor percentagem de deslignificação, entretanto, não pode ser creditada à perda de atividade durante o pré-branqueamento pois foi demonstrado anteriormente (26) que a enzima lacase A é estável por 6 horas nesta condição com perda máxima da atividade menor do que 10% no final deste período, como o tempo de pré-branqueamento foi de 1 hora a perda da atividade durante o pré-tratamento foi insignificante e não justifica por si só uma queda na eficiência da ação enzimática.

As amostras tratadas nestas condições (Lb) apresentaram apenas 8,8% de deslignificação aumentando para 11% após a extração (LbE). Pode-se observar que a mudança nas condições de atuação da enzima lacase afeta a deslignificação durante a etapa enzimática e a eficiência da extração alcalina posterior. Isto sugere que a temperatura e pH utilizados durante o pré-branqueamento podem influenciar no tipo de degradação causado pela lacase, ou seja, a formação de determinados compostos de degradação pode ser favorecida. Este fato fica mais evidente quando se observa a deslignificação de polpas submetidas as sequências LaE-DEDED e LbE-DEDED após o segundo estágio de extração alcalina (branqueamento químico), onde a polpa pré-tratada a 55°C/pH 8,0 (Lb) alcançou uma deslignificação de 95% contra apenas 87% obtida para a polpa pré-tratada a 30°C/pH 5,0 (La). O tipo de degradação ocorrido durante a deslignificação pela lacase a pH 8,0 e temperatura de 55°C, apesar de apresentar uma eficiência de deslignificação inicial menor, foi capaz de aumentar a eficiência das etapas posteriores de branqueamento químico, ou seja, a degradação inicial nestas condições, forma compostos que são aparentemente mais vulneráveis aos reagentes químicos durante o branqueamento convencional.

Na Figura 2 são apresentados os perfis de redução da viscosidade ao longo dos estágios de biobranqueamento e branqueamento químico. Observa-se que houve uma redução inicial de 3,5% e 1,1% na viscosidade das polpas pré-branqueadas nas condições La e Lb, respectivamente, concluindo-se que o tratamento enzimático por si só não afetou a viscosidade da polpa de maneira significativa, uma vez que a preparação enzimática utilizada não apresentava atividade celulásica.

A amostra pré-branqueada a 30°C/pH 5,0 (La) apresentou apenas 23,8% de redução da viscosidade no final da sequência de branqueamento químico. Esse valor foi inferior ao obtido para o ensaio controle (sequência DEDED), cuja redução de viscosidade foi de 28,8% e, muito inferior ao ensaio controle utilizando cloro (sequência CEDED) que apresentou uma redução de 51% na viscosidade. Amostras tratadas a 55°C/pH 8,0 (Lb), no entanto, não apresentaram o mesmo comportamento. Embora a redução inicial tenha sido inferior as demais, ou seja, de apenas 1,1%, a redução da viscosidade no final da sequência completa de branqueamento foi de 40%, valor inferior ao controle com cloro, mas superior ao controle com dióxido. Pode-se observar ainda (Figura 2) que a redução acentuada da viscosidade ocorreu entre o primeiro e segundo estágio de extração alcalina, da sequência de branqueamento, concomitantemente a uma intensa deslignificação (Figura 1). Esta é mais uma evidência de que, nestas condições (Lb), o pré-branqueamento com lacase causou algum tipo de degradação da lignina que resultou em compostos mais facilmente removíveis pelos reagentes químicos nas etapas iniciais de branqueamento, deixando a celulose mais exposta a degradação nos estágios finais.

O perfil de alveamento (Figura 3) mostra o aumento progressivo da alvura ao longo das etapas de biobranqueamento. Observa-se que embora não tenha ocorrido aumento da alvura durante as etapas iniciais (pré-tratamento enzimático), as amostras pré-tratadas apresentaram um ganho significativo em alvura durante as etapas de branqueamento. O maior delta de alvura foi observado nas amostras pré-tratadas a 30°C/pH 5,0 (La) após a primeira extração alcalina do branqueamento químico, que apresentou uma alvura de 66 %ISO contra apenas 50,6 %ISO e 51,5 %ISO para os controles CEDED e DEDED, respectivamente.

Outro fato interessante ocorreu após a segunda etapa de dioxidação e extração alcalina. As amostras submetidas ao pré-tratamento a 55°C/pH 8,0 (Lb) apresentaram alvuras de 80,7 %ISO e 87,1 %ISO para as sequências LbE-DEDED e LbE-DEpDED, respectivamente, após a segunda dioxidação, entretanto, após a extração alcalina, essas amostras apresentaram praticamente a mesma alvura, embora na sequência LbE-DEpDED tenha sido aplicada uma carga muito maior de reagentes.

Na Figura 4, pode ser observado o efeito do uso de peróxido de hidrogênio durante a extração alcalina para polpas pré-branqueadas nas condições La e Lb. Para as amostras pré-branqueadas a 30°C/pH 5,0 (La), o uso do peróxido apesar de não contribuir para a redução do número Kappa, foi capaz de aumentar a alvura de 66 para 73,9 %ISO, com uma perda relativamente pequena da viscosidade. Para as amostras submetidas ao tratamento a 55°C/pH 8,0 (Lb), a adição de peróxido durante a extração alcalina resultou na redução do número Kappa de 4,3 para 3,8 e no aumento de alvura de 60,8 para 73,8 %ISO, sem perda acentuada de viscosidade. Todas as amostras submetidas ao pré-branqueamento enzimático apresentaram números Kappa menores que o controle com dióxido (sequência DE), alvura e viscosidades superiores ao mesmo.

A Figura 5 apresenta os valores finais de número Kappa, redução da viscosidade, alvura, reversão da alvura e consumo de  $\text{ClO}_2$  das amostras pré-branqueadas nas condições La e Lb. As amostras pré-branqueadas a 30°C/pH 5,0 (La) seguida de extração alcalina simples apresentaram alvuras menores e viscosidades finais superiores às obtidas nos controles com dióxido (DEDED) e com cloro (CEDED). Já as amostras submetidas à extração com peróxido de hidrogênio, apesar da viscosidade obtida ser um pouco menor que as demais, a alvura de 90,2 %ISO, foi superior aos valores obtidos nos controles com dióxido (89% ISO) e com cloro (89,3% ISO).

Todas as amostras pré-branqueadas a 55°C/pH 8,0 (Lb) apresentaram alvuras superiores aos controles (Figura 5). O pré-branqueamento resultou em polpas com alvura de 89,5% ISO. O uso do peróxido de hidrogênio foi capaz de elevar a alvura para 90,7 %ISO. Em ambas sequências, os valores de viscosidade foram inferiores ao controle com dióxido, entretanto, os valores obtidos são compatíveis com os observados em polpas industriais.

O pré-branqueamento a 30°C/pH 5,0 (La) apesar de apresentar uma maior designificação inicial, não foi efetivo quanto à alvura final da amostra, cujo valor foi inferior aos alcançados nos ensaios controle. O melhor resultado foi obtido quando as amostras foram pré-branqueadas com lacase a 55°C/pH 8,0 (Lb) elevando a alvura para 89,5 % ISO, superior aos controles com dióxido e com cloro, e com uma reversão da alvura de apenas 2,9 %. Além disso, o consumo de dióxido na etapa final de branqueamento foi de apenas 68,5%, o que significa uma economia de  $\text{ClO}_2$  de aproximadamente 30% nesta etapa, correspondendo a uma redução na carga total de dióxido usada nesta sequência de branqueamento, de cerca de 7%.

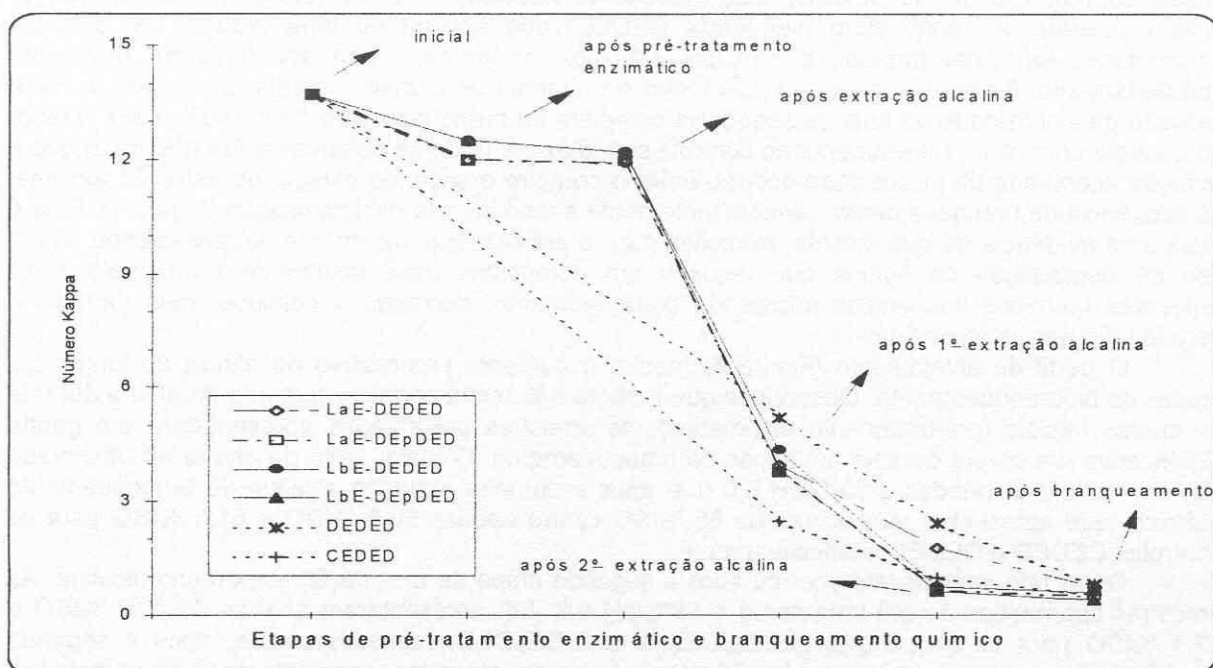


Figura 1: Perfil de deslignificação da pasta celulósica 1 (P<sub>1</sub>) ao longo do pré-tratamento com lacase e do branqueamento químico

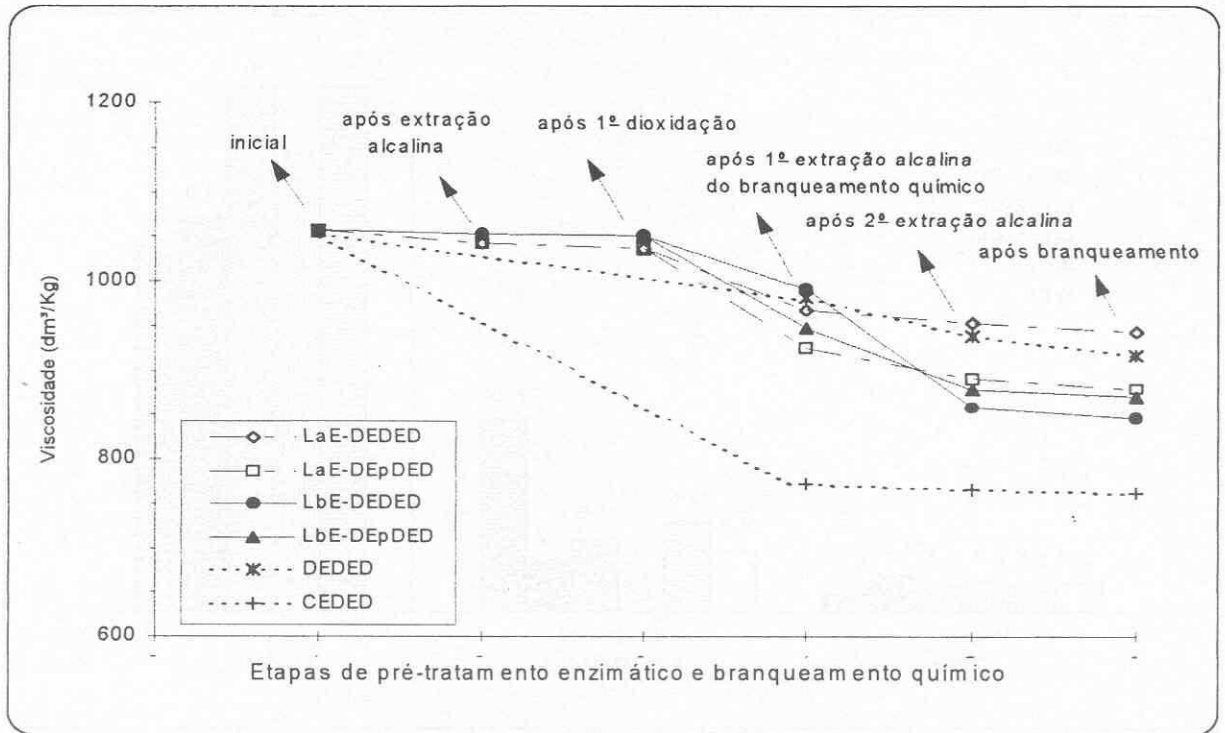


Figura 2: Perfil de degradação da pasta celulósica 1 ( $P_1$ ) ao longo do pré-tratamento com lacase e do branqueamento químico

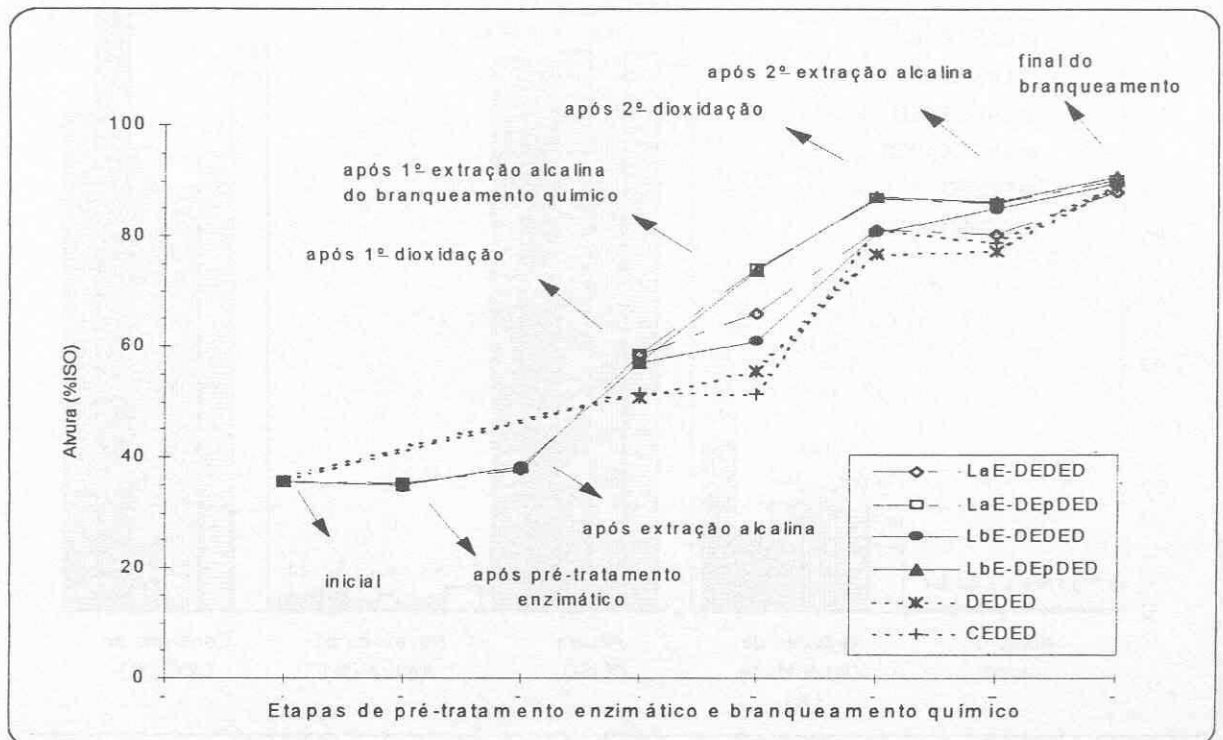


Figura 3: Perfil de alveamento da pasta celulósica 1 ( $P_1$ ) ao longo do pré-tratamento com lacase e do branqueamento químico



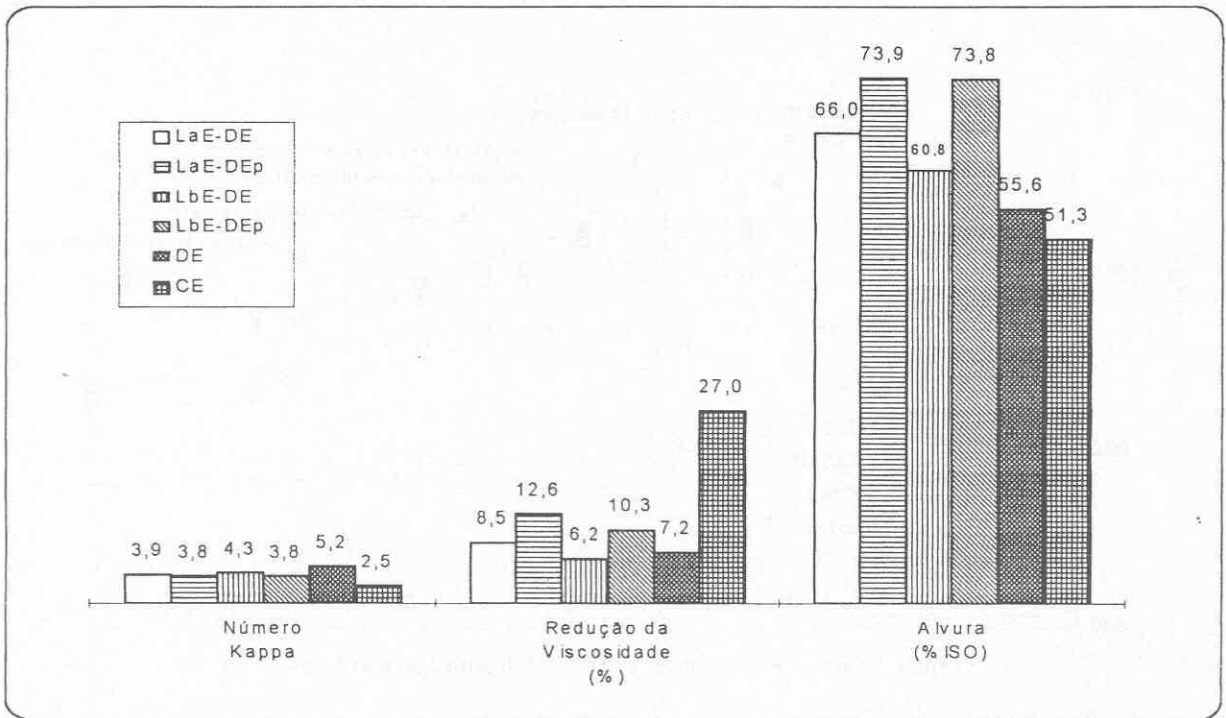


Figura 4: Avaliação da deslignificação, degradação da fibra e alvura da pasta celulósica 1 (P<sub>1</sub>) no estágio de extração alcalina

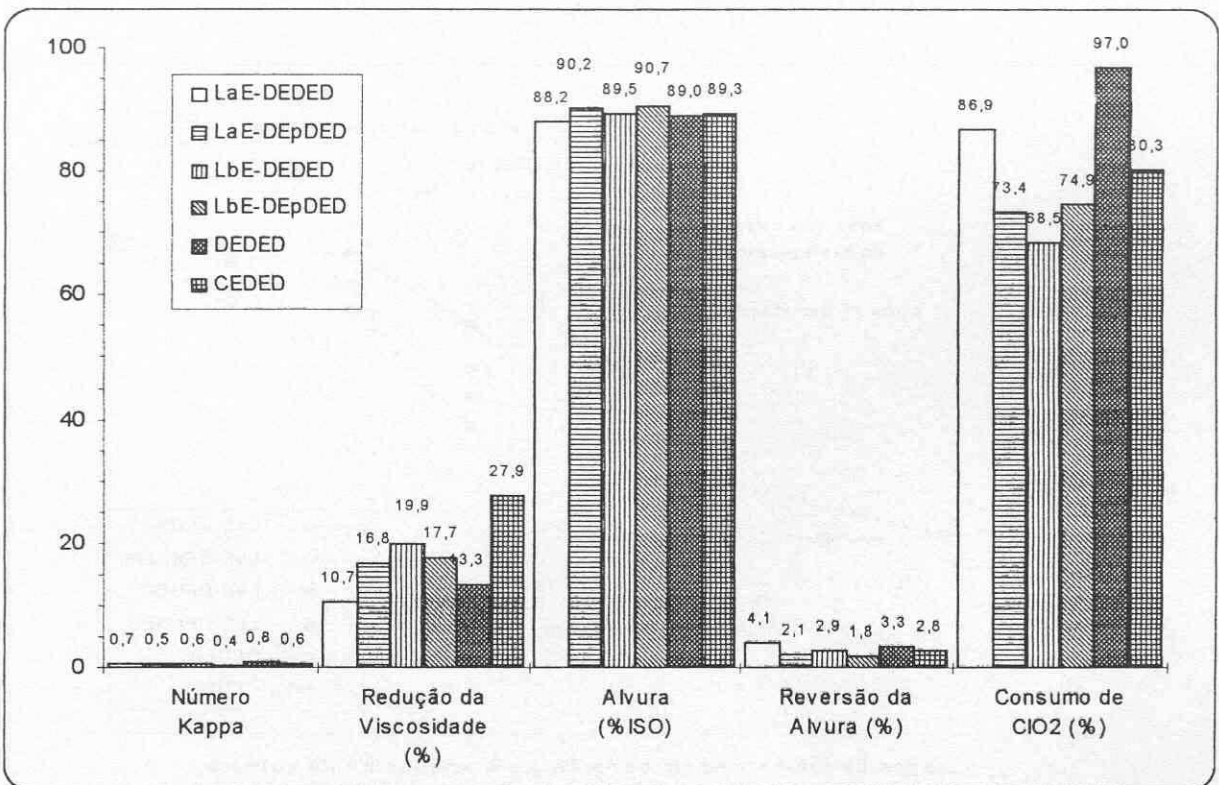


Figura 5: Avaliação da deslignificação, degradação da fibra, alvura, reversão da alvura da pasta celulósica 1 (P<sub>1</sub>) e consumo de ClO<sub>2</sub> ao final do bibranqueamento

## **Biobranqueamento da Pasta Celulósica 2 (P<sub>2</sub>)**

A pasta celulósica 2 (P<sub>2</sub>) foi biobranqueada com a enzima lacase produzida em duas diferentes condições de pH. A lacase A foi produzida em pH 5,0 e a lacase B foi obtida em pH 6,5 (Tabela V).

Nesta fase foi utilizada uma sequência de branqueamento mais branda. A carga de dióxido utilizada, quando comparada à carga empregada nos biobranqueamentos anteriores, foi reduzida em cerca de 20% na sequência DEDED e de 40% na sequência DEpDED (Tabela VI), com vistas a melhor avaliar a atuação das enzimas durante o biobranqueamento.

As Figuras 6a e 6b apresentam os perfis de deslignificação das amostras pré-tratadas enzimaticamente e submetidas ao branqueamento DEDED e DEpDED, respectivamente. As amostras pré-tratadas com a lacase A a 30°C/pH 5,0 (La) apresentaram uma deslignificação real de 9,7%, maior que a observada em amostras tratadas com lacase B a 30°C/pH 6,5 (Lc) cuja deslignificação foi de apenas 5,8%. Já as amostras pré-tratadas a 55°C/pH 8,0 (Lb) e a 55°C/pH 7,0 (Ld) utilizando lacase A e lacase B, respectivamente, apresentaram uma maior deslignificação, cerca de 12,3%. Nesta etapa a deslignificação apresentada pelo controle \*EDED foi de apenas 1,3%.

Após a primeira dioxidação, as amostras pré-tratadas com a sequência LaEDED apresentaram uma deslignificação de 55,5% enquanto as demais sequências apresentaram cerca de 50%. Neste ponto, observou-se nos controles EDED e \*EDED uma deslignificação de 45,8% e 46,5% enquanto no controle DEDED a deslignificação foi de 55%. Na etapa posterior, primeira extração alcalina do branqueamento químico, ocorre uma inversão, as amostras submetidas à sequência LbEDED passam a apresentar uma deslignificação maior que as da sequência LaEDED. Este fato persiste até ao final do branqueamento resultando em valores de número Kappa de 1,0 e 0,7, respectivamente, para as sequências LaEDED e LbEDED.

Embora, no início do branqueamento, o controle DEDED tenha apresentado uma deslignificação semelhante a observada na sequência LaEDED, no final do branqueamento, a deslignificação do controle foi de apenas 89% contra 93,5% e 95,5% para as sequências LaEDED e LbEDED.

Em termos de deslignificação, a enzima lacase A foi mais eficiente quando aplicada a 55°C/pH 8,0 (LbEDED), entretanto, como será visto mais adiante, a sequência LaEDED (30°C/pH 5,0) apresentou a melhor alvura. A enzima lacase B também apresentou bom resultado a 55°C/pH 7,0 (LdEDED), com uma deslignificação de 94,2% contra 91% e 91,6% para os controles EDED e \*EDED.

Na Figura 6b, observa-se que o perfil de deslignificação das amostras submetidas ao branqueamento DEpDED é semelhante ao apresentado anteriormente. Para a sequência LaEDEpDED, a adição de peróxido de hidrogênio durante a extração alcalina aumentou a deslignificação, nesta etapa, de 63,9% para 70,3% resultando num número Kappa de 0,6 ao final do branqueamento. Entretanto, para a sequência LbEDEpDED, a adição de peróxido praticamente não teve efeito sobre a deslignificação. As diferenças entre as sequências LaEDEpDED e LbEDEpDED são as condições de aplicação da enzima lacase A. Na primeira sequência ela foi aplicada a 30°C/pH 5,0 (condição ideal para sua atuação) e, na segunda, a 55°C/pH 8,0. Observa-se que essas diferenças nas condições iniciais de aplicação da enzima influenciam não só na deslignificação inicial durante o pré-tratamento mas, também, no decorrer do branqueamento químico.

Quando a enzima lacase B foi utilizada, sequências LcEDEpDED e LdEDEpDED (Figura 6b), a aplicação de peróxido na extração elevou a deslignificação de 62,6% para 65,8% e de 61,9% para 70%, respectivamente. Aqui também pode ser observado que a alteração das condições de aplicação da enzima afetou o desempenho do peróxido de hidrogênio durante o branqueamento.

Durante o pré-tratamento enzimático podem ocorrer tanto a deslignificação quanto alterações na estrutura da lignina remanescente. Dependendo das condições de temperatura e pH de aplicação das enzimas, a deslignificação ou as alterações da estrutura são favorecidas resultando, muitas vezes, numa menor deslignificação inicial acompanhada de uma melhora significativa ao longo do branqueamento químico.

Nas Figuras 7a e 7b são mostrados os perfis de redução da viscosidade das amostras submetidas ao pré-tratamento enzimático e ao branqueamento DEDED e DEpDED, respectivamente. Nota-se na Figura 7a que o tratamento enzimático foi responsável por uma redução de viscosidade de 5,2%; 1,4%; 0,3% e 0,4% para as etapas La; Lb; Lc e Ld, respectivamente. Podendo-se concluir que o tratamento enzimático em si não afetou a viscosidade das amostras, uma vez que os extratos

enzimáticos não apresentavam atividade celulásica. Observa-se, ainda, que as pastas biobranqueadas apresentaram praticamente o mesmo perfil de redução da viscosidade dos controles EDEDED e \*EDEDED. Já o controle DEDED foi o que apresentou a maior redução da viscosidade.

Quando as amostras foram branqueadas pela sequência DEpDED (Figura 7b) observou-se uma redução mais acentuada da viscosidade, principalmente, na etapa de extração com peróxido. Neste ponto, as amostras submetidas à condição Ld apresentaram uma intensa perda de viscosidade concomitante a uma maior deslignificação apresentada na Figura 6b.

Nas Figuras 8a e 8b são apresentados os valores de alvura obtidos em cada etapa do pré-tratamento enzimático e branqueamento DEDED e DEpDED, respectivamente. Embora a enzima lacase A (LaEDEDED e LbEDEDED) tenha produzido certa deslignificação, não houve melhora na alvura após a etapa de pré-tratamento enzimático. Entretanto, a sequência LcEDEDED (lacase B - 30°C/pH 6,5) que apresentou apenas 5,8% de deslignificação (Figura 6a) resultou numa pequena melhora na alvura que passou de 36 %ISO para 37 %ISO.

Após o primeiro estágio de dioxidação, a sequência LaEDEDED apresentou uma alvura de 50,4 %ISO contra 51,5 %ISO para a sequência LbEDEDED, no entanto, a sequência La apresentou uma deslignificação de 55,5%, maior que a Lb (50,3%). Isso é mais um indicativo de que a mudança das condições de aplicação da enzima de 30°C/pH 5,0 para 55°C/pH 8,0 favoreceu algum tipo de alteração na estrutura da lignina que, modificando os grupos cromóforos, contribuiu para aumentar a alvura sem, contudo, remover a lignina.

Desta maneira, acredita-se que a avaliação do tratamento enzimático não pode ser feito apenas após a etapa enzimática. Há uma série de fatores que devem ser levados em consideração ao longo do branqueamento. A atuação da enzimas embora não apresente grandes ganhos na etapa inicial, melhora a branqueabilidade da pasta celulósica ao longo das etapas de branqueamento, quer pela deslignificação promovida inicialmente quer por alterações na estrutura da lignina que embora não resultem em redução do número Kappa podem representar ganhos em alvura.

Conforme mencionado anteriormente, a adição de peróxido na sequência LbEDEpDED não melhorou a deslignificação (Figura 6a e 6b), entretanto, comparando-se as Figuras 8a e 8b, observa-se que houve aumento considerável da alvura que passou de 58,4 %ISO para 74 %ISO. Nos controles, a alvura máxima obtida nesta etapa foi de 70 %ISO. A sequência LdEDEDE também apresentou um bom resultado, além do aumento da deslignificação, a utilização do peróxido durante a extração alcalina promoveu um aumento de alvura de 58,1 %ISO para 74,8 %ISO (Figura 8b).

Na Figura 9a e 9b apresenta os valores de número Kappa, redução da viscosidade, alvura, reversão da alvura e consumo de ClO<sub>2</sub> ao final do branqueamento DEDED e DEpDED. Com relação ao número Kappa, observa-se na figura 9a que a sequência LbEDEDED (lacase A - 55°C/pH 8,0) apresentou o melhor resultado, número Kappa igual a 0,7. Nesta sequência, a redução da viscosidade foi compatível com os valores obtidos para os controles e a alvura de 84,7 %ISO foi superior os controles DEDED; EDEDED e \*EDEDED, cujas alvuras observadas foram, respectivamente, 83,5 %ISO; 83,6 %ISO e 83,2 %ISO.

As sequências LcEDEDED e LdEDEDED resultaram em amostras com alvuras de 84,8 %ISO e 84,6 %ISO e cuja reversão foi de apenas 2,7% e 3,0%, respectivamente. Quanto ao consumo de dióxido de cloro, apenas a sequência LdEDEDED apresentou um consumo de 93,4%, valor um pouco menor que o observado para os controles.

O melhor resultado quanto a alvura foi obtido quando as amostras foram pré-tratadas com lacase A a 30°C/pH 5,0 (LaEDEDED), que apesar de apresentar número Kappa igual a 1,0 (superior as demais sequências enzimáticas), resultou em valores de alvura e reversão da alvura de 85,6 %ISO e 3,0%, respectivamente, com um consumo de 96,7% de dióxido de cloro na última etapa do branqueamento.

Quando as amostras foram submetidas ao branqueamento DEpDED (Figura 9b), as sequências LaEDEpDED; LbEDEpDED e LdEDEpDED apresentaram a mesma eficiência quanto à redução do número Kappa, entretanto, a redução da viscosidade foi mais acentuada nas sequências LcEDEpDED e LdEDEpDED, sendo nesta última, superior ao controle DEpDED. Em relação à alvura, todas as sequências pré-tratadas enzimaticamente apresentaram alvuras superiores aos controles mas o melhor resultado foi o observado em amostras submetidas a sequência LdEDEpDED (lacase B - 55°C/pH 7,0), cujo valor foi de 88,6 %ISO contra 87 %ISO para os controles DEpDED e EDEpDED e 86,5 %ISO para o controle \*EDEpDED.



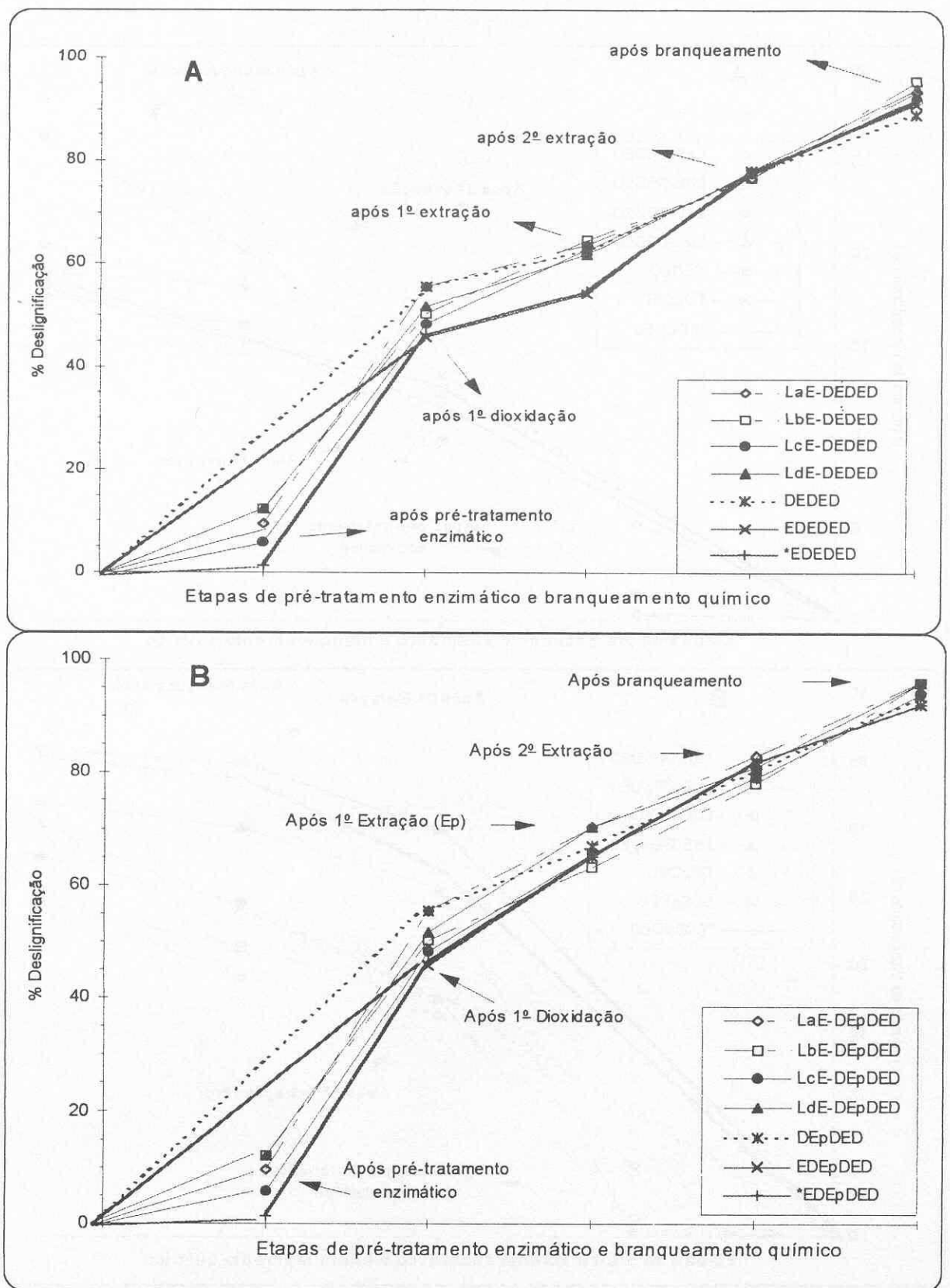


Figura 6: Perfil de designificação da pasta celulósica 2 (P<sub>2</sub>) ao longo do pré-tratamento com lacase e do branqueamento químico DEDED (A) e DEpDED (B)



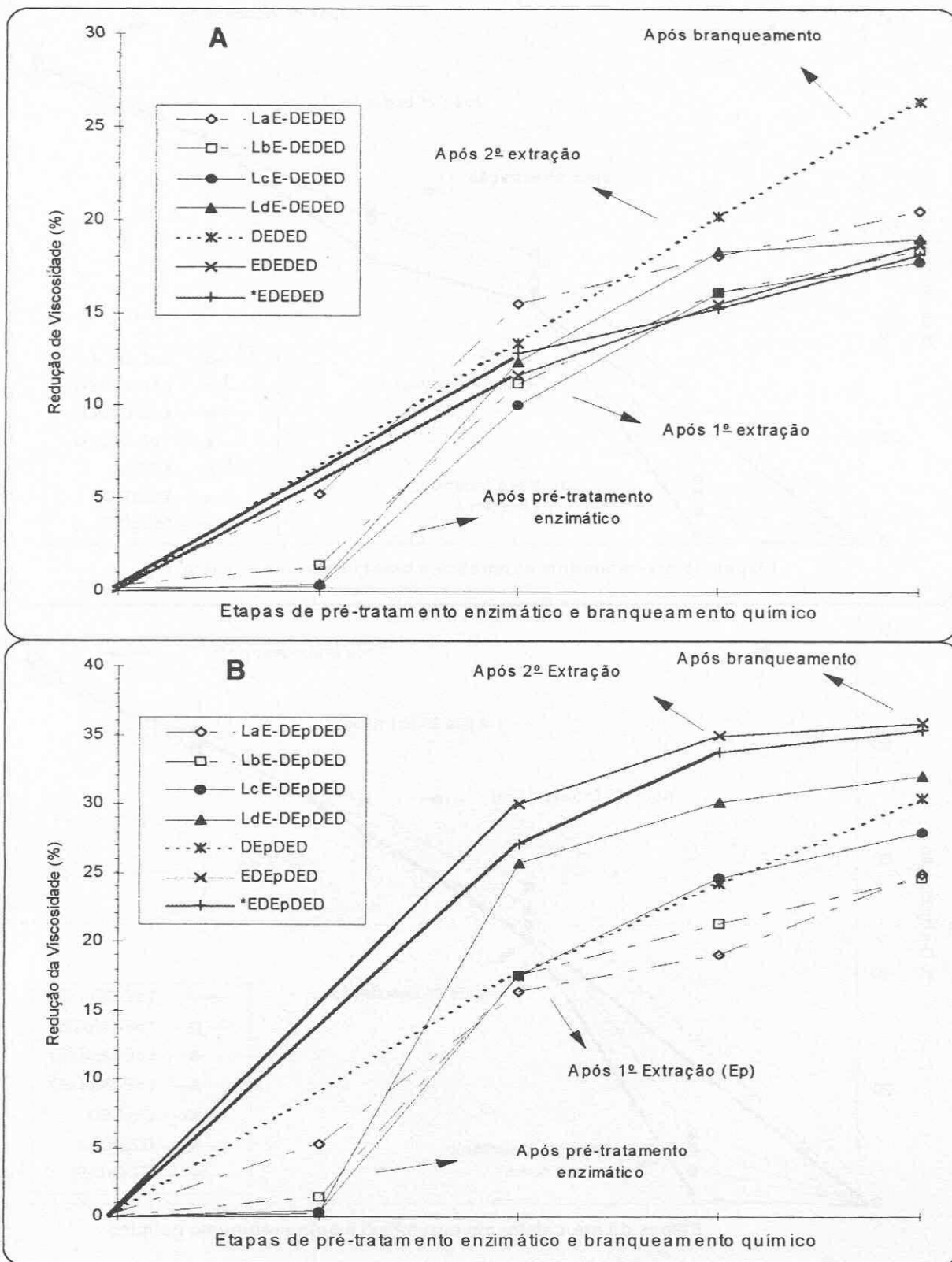
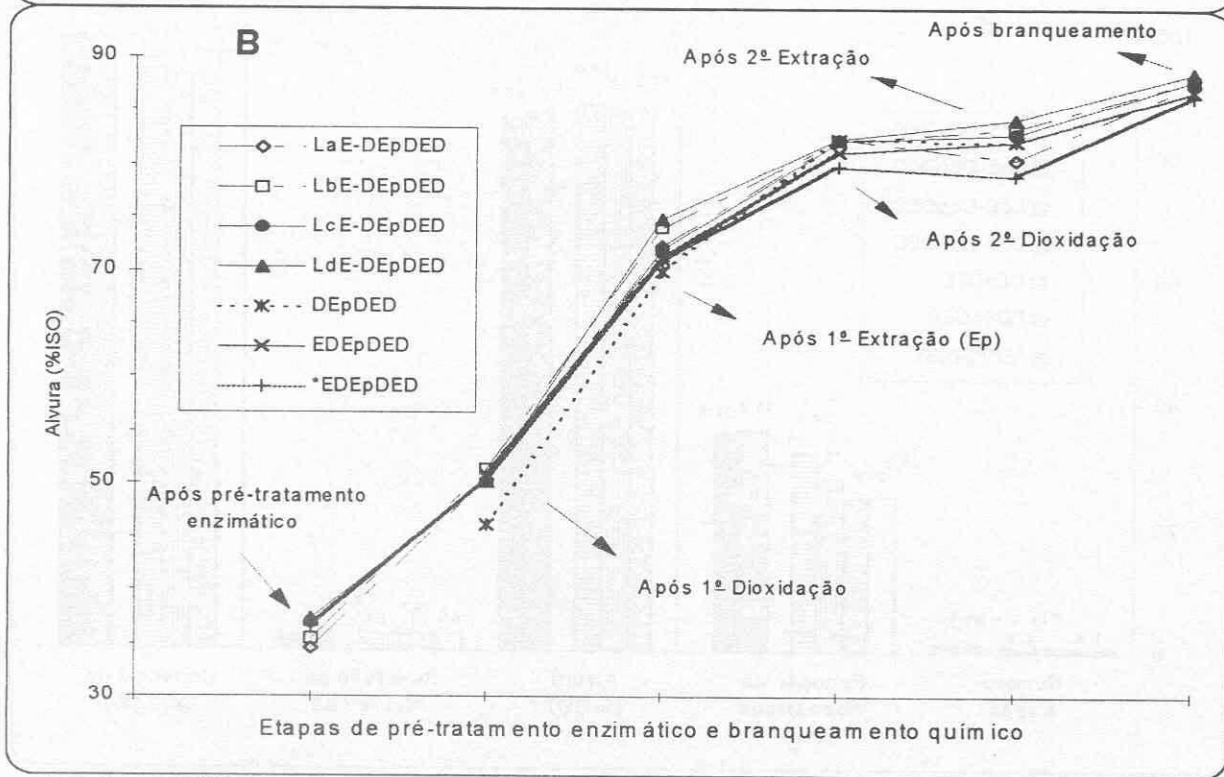
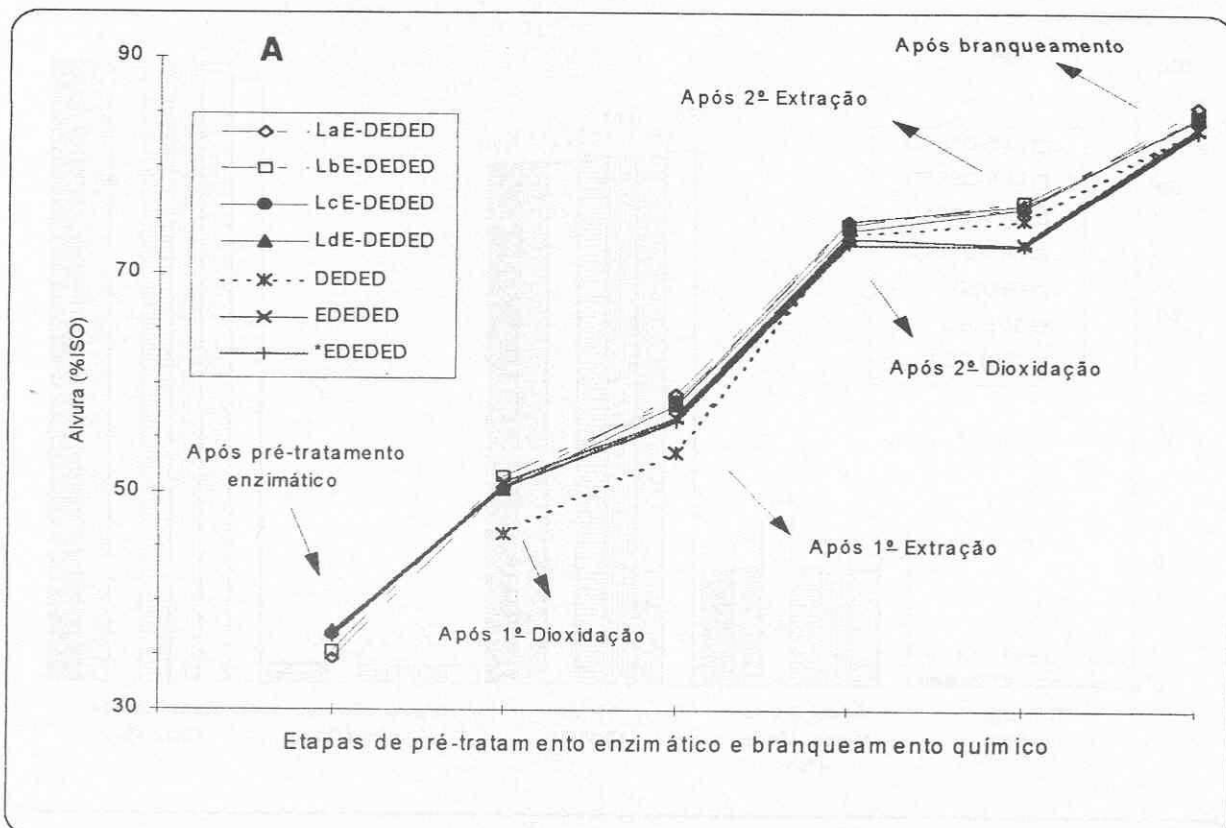


Figura 7: Perfil de degradação da fibra celulósica 2 (P<sub>2</sub>) ao longo do pré-tratamento com lacase e do branqueamento químico DEDED (A) e DEpDED (B)



Alvura inicial: 36 %ISO.

**Figura 8:** Perfil de alveamento da pasta celulósica 2 (P<sub>2</sub>) ao longo do pré-tratamento com lacase e do branqueamento químico DEDED (A) e DEpDED (B)

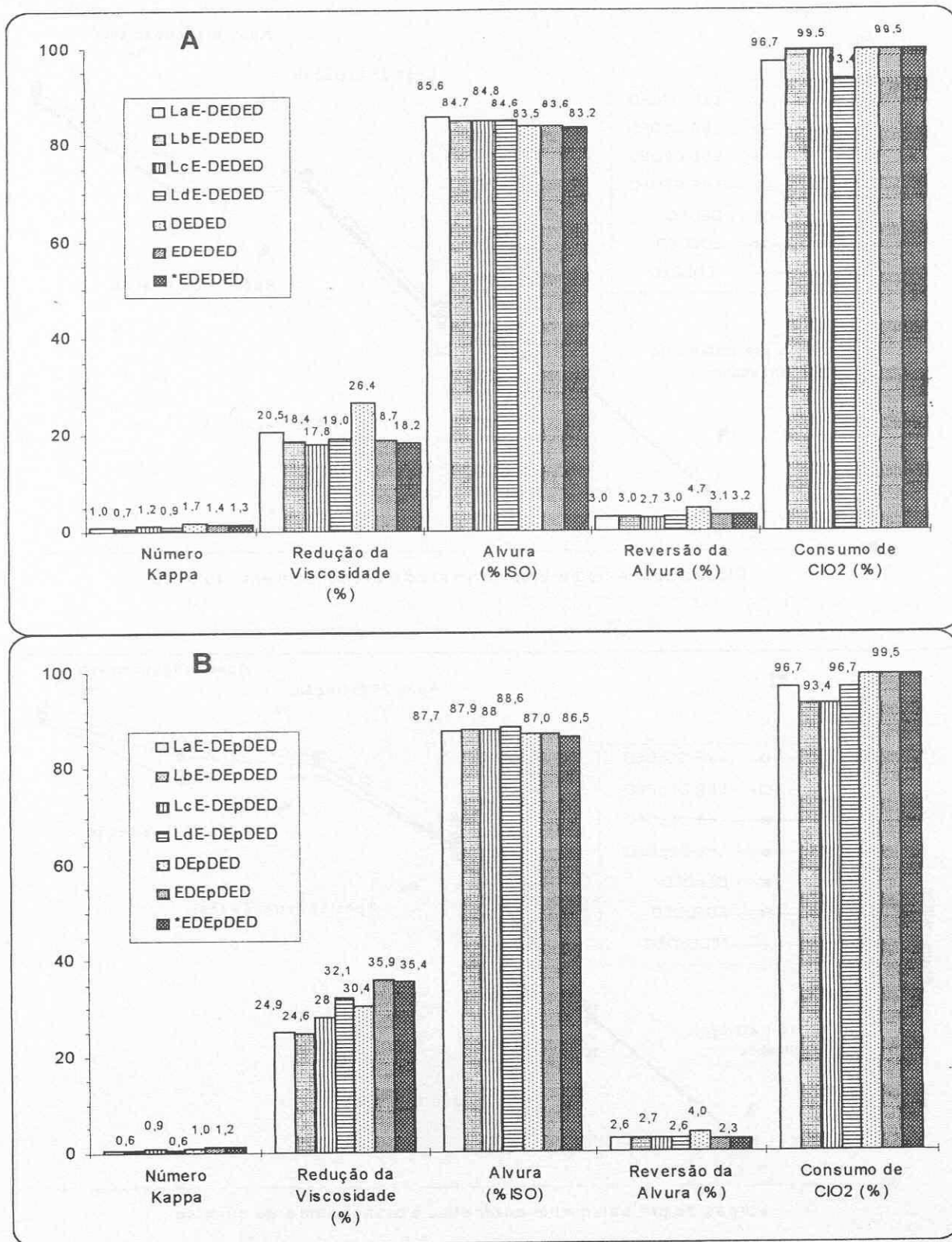


Figura 9: Avaliação da deslignificação, degradação da fibra, alvura, reversão da alvura da pasta celulósica 2 (P<sub>2</sub>) e o consumo de ClO<sub>2</sub> ao final do bibranqueamento DEDED (A) e DEpDED (B)

## CONCLUSÃO

Duas pastas celulósicas Kraft de diferentes procedências foram avaliadas quanto a uma seqüência de pré-tratamento com a enzima lacase associada ao branqueamento químico.

A pasta celulósica 1 (P<sub>1</sub>) foi pré-branqueada com a enzima lacase A produzida em pH 5,0. Os tratamentos foram efetuados em duas condições distintas de pH e temperatura, uma correspondendo às melhores condições de atuação da enzima e denominada La (30°C/pH 5,0) e, outra, em condições mais compatíveis com a utilização industrial e denominada Lb (55°C/pH 8,0). As seqüências de branqueamento utilizadas foram DEDED e DEpDED.

Os resultados de deslignificação obtidos após o pré-branqueamento revelou uma redução de Número Kappa de 12,4% e 8,8% para os tratamentos La e Lb, respectivamente. Com relação à redução da viscosidade, os dados obtidos foram de 3,5% e 1,1% para as mesmas seqüências de pré-branqueamento, demonstrando que o tratamento enzimático não afetou significativamente a viscosidade da polpa.

As diferentes condições de pré-branqueamento, entretanto, resultaram em diferenças significativas no decorrer das etapas de branqueamento químico. As amostras pré-branqueadas com a condição Lb apresentaram uma deslignificação inicial menor, entretanto, a deslignificação foi acentuada ao longo das etapas de branqueamento, sugerindo, que nesta condição, o tipo de degradação causado pela enzima lacase A, no pré-branqueamento, aumentou a eficiência dos agentes branqueadores nas etapas posteriores.

Com relação às polpas obtidas no final da seqüência de branqueamento químico, as amostras pré-branqueadas com lacase A em pH 8,0 e temperatura de 55°C (LbEDED) apresentaram alvura de 89,5% ISO e reversão da alvura de 2,9%. Quando, após o tratamento enzimático, foi utilizada uma seqüência de branqueamento com uma extração alcalina associada com peróxido de hidrogênio, os valores de alvura foram incrementados, alcançando 90,7% ISO. O uso da seqüência LbEDED resultou em polpas com alvura superior ao controle DEDED e viscosidade compatível com as polpas industriais, além de possibilitar uma redução de 7% da carga total de dióxido de cloro utilizada nesta seqüência de branqueamento.

A pasta celulósica 2 (P<sub>2</sub>) foi submetida ao pré-tratamento enzimático com a enzima lacase A produzida em pH 5,0 (condições La e Lb) e com a enzima lacase B produzida em pH 6,5 (condições Lc e Ld). Os pré-tratamentos enzimáticos foram associados ao branqueamento químico DEDED e DEpDED. Neste caso, as seqüências de branqueamento utilizadas foram mais brandas para que se pudesse avaliar melhor a atuação das enzimas.

As amostras provenientes da seqüência LbEDED (55°C/pH 8,0) apresentaram maior deslignificação que as demais, resultando em número Kappa em torno de 0,7 ao final do branqueamento, entretanto, a melhor alvura foi observada em amostras da seqüência LaEDED (30°C/pH 5,0) cujo valor foi de 85,6 %ISO contra 83,5 %ISO; 83,6 %ISO e 83,2 %ISO para os controles DEDED; EDED e \*EDED.

Para as amostras submetidas à extração alcalina com peróxido, as seqüências LaEDED; LbEDED e LdEDED (55°C/pH 7,0) apresentaram praticamente a mesma deslignificação final, porém, a seqüência LdEDED foi acompanhada por uma maior redução da viscosidade. Em relação aos valores de alvura e reversão da alvura obtidos, todas as amostras submetidas ao pré-tratamento enzimático resultaram em alvuras superiores aos controles e reversão compatível aos mesmos. O melhor resultado foi observado em amostras provenientes da seqüência LdEDED com alvura de 88,6 %ISO contra 87 %ISO para os controles DEDED e EDED e 86,5 %ISO para o controle \*EDED.

Através dos resultados obtidos, concluiu-se que o pré-tratamento enzimático não pode ser avaliado isoladamente. Apesar de não apresentar grandes ganhos iniciais, a inclusão de uma etapa enzimática melhora a branqueabilidade da pasta celulósica ao longo do branqueamento químico. Além disso, o tipo de madeira, a condição de aplicação da enzima durante o pré-tratamento enzimático e a seqüência de branqueamento utilizada também influenciam nos resultados finais. Resultados melhores poderão ser obtidos ajustando-se o pré-tratamento enzimático à sua seqüência ideal de branqueamento químico.



## BIBLIOGRAFIA

- 1-PARTHASARATHY, V. & RUDIE, G. *Tappi Journal*, 79: 171-179, 1996.
- 2-SEGER, G.E. *Tappi Journal*, 79(6): 174-180, 1996.
- 3-NI, Y. & OOI, T. *Tappi Journal*, 79(10):167-172, 1996
- 4-BOUCHARD, J. et al. *Tappi Journal*, 78(1): 74-82, 1995.
- 5-MOKFIENSKI, A. & DEMUNER, B.J. *Tappi Journal*, 77(11): 95-103, 1994.
- 6-NUTT, W.E. et al. *Tappi Journal*, 76(3): 11123, 1993.
- 7-BROWN, J. et al. *Tappi Journal*, 77 (11): 105-109, 1994.
- 8-STRUNK, W.G. & KLEIN, R.J. *Tappi Journal*, 75(7): 181-186, 1992.
- 9-LIEBERGOTT, N. *Pulp Paper Canada*, 97(3): 73-75, 1996.
- 10-PANGALOS, G. *Pulp Paper Canada*, 97(3): 42-46, 1996.
- 11-BARNA, J. et al. *O Papel*, 11: 69-74, 1996.
- 12-KIRK, T.K. in : *Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals* : 131, A. Hollaender, ed., 1981.
- 13-ANDER, P. & ERIKSSON, K.E. *Progress in Industrial Microbiology*, 14:1- 58, 1978.
- 14-HIGUCHI, T. *Lignin Biodegradation, Microbiology and its potential applications*. Vol. I : 171 - 194, CRC Press, 1980.
- 15-CHANG, H.M. et al. Chemistry of lignin degradation by white-rot fungi. *Lignin Biodegradation, Microbiology and its potential applications*. Vol. I : 215 - 230, CRC Press, 1980.
- 16-ERIKSSON, K.E. & KIRK, T.K. *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Pergamon Press, Toronto, 1983.
- 17-BHANDARI, K.S. & SRIVASTAVA, A. *Cellulose Chem. Technol.*, 25 : 99 - 105, 1992.
- 18-PAICE, M.G. et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (1) : 260 -265, 1993.
- 19-REID, I.D. & PAICE, M.G. *FEMS Microbiology Reviews*, 13 : 369 - 376, 1994.
- 20-BOURBONNAIS, R. & PAICE, M.G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 823 - 827, 1992.
- 21-PAICE, M.G. et al. *Tappi Journal*, 21 (5) : 217 - 221, 1989.
- 22-MONTEIRO, M.C. & CARVALHO, M.E.A. de *Appl. Biochem. Biotech.*, (in press) 1998.
- 23-SZKLARZ, G. et al. *Mycologia*, 81 (2) : 234 - 240, 1989.
- 24-MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v. 6, p. 21 - 33, 1976.
- 25-MONTEIRO, M.C. & CARVALHO, M.E.A. de. In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 30, São Paulo, 03-07 nov. 1997. *Programas e Resumos*. São Paulo: Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel, 1997. p. 722.
- 26-MONTEIRO, M.C. et al. *Proceedings. 20<sup>th</sup> Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemical*. Gatlinburg, Tennessee, USA, may 3-7, 1988.