



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

## **Relatório de Atividade Profissional**

**Cristina Maria dos Santos Gil Passos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Industrial**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria Carreira Lopes

**Covilhã, Junho de 2012**

*Aos meus pais,  
que sempre acreditaram no meu empenho,  
pela amizade, motivação e carinho.*

# Agradecimentos

Quero aqui expressar o meu agradecimento a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta etapa e a quem desejo manifestar a minha gratidão.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Maria Carreira Lopes, que me incentivou a apresentar este trabalho, pelas suas valiosas sugestões, pela total disponibilidade e amizade que sempre demonstrou, pelo estímulo e apoio.

À Professora Doutora Ana Paula Duarte, pela sua amizade e pela oportunidade dada em participar na investigação que desenvolvia, no Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel, contributo essencial para este trabalho.

À João, à Zé e à Dulce pelo estímulo sincero e contínuo nesta minha caminhada.

Aos elementos do Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel, com quem partilhei vários momentos da minha carreira, pelo seu companheirismo e apoio.

Ao Carlos e às minhas meninas, Bibi e Marianinha, pilares da minha vida, pelo carinho e apoio incondicional.

# Preâmbulo

Tendo por base o Contrato de Confiança no Ensino Superior para o Futuro de Portugal, assinado em 2010 pelas Instituições de Ensino Superior e o Governo, o Conselho de Reitores das Universidades Portuguesas (CRUP) recomendou às Universidades que adotassem mecanismos adequados, uma vez que *“importa desenvolver a capacidade de atração dos licenciados pré-Bolonha para o seio das universidades criando mecanismos que permitam, com equidade e rigor proporcionar formação complementar e permitir através dessas iniciativas que os licenciados pré-Bolonha possam adquirir o grau de Mestre”*<sup>1</sup>.

Perante tais requisitos, esta síntese do meu currículo mostra os factos mais relevantes do meu percurso, ao longo dos últimos anos.

Ao apresentar o meu percurso profissional perante a Universidade da Beira Interior (UBI) e a Comissão de Curso do 2º ciclo de Química Industrial, tenho a convicção de que a trajetória configurada na formação adquirida, quer no bacharelato em Engenharia Química Industrial quer na licenciatura em Química Industrial e ainda consolidada em experiência profissional, com competências adquiridas ao longo de 20 anos, é suficiente para ser creditado o grau de Mestre, agora em apreciação.

A minha carreira, pelas suas características próprias, resulta de dois percursos, o académico e o profissional, que culminaram no mesmo cruzamento, a UBI. O primeiro ocorreu no ano de 1990, após ingresso no 1º ano do curso de Química Industrial. O segundo surgiu em março de 1993, quando, após concurso público, ingressei no Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel (DCTP) como Técnica Estagiária.

Em outubro de 1996 a conclusão da licenciatura em Química Industrial deu-se com a apresentação do projeto de fim de curso intitulado “Estudo da variação da composição química da madeira de *Eucalyptus Globulus* no processo Kraft e dos produtos de degradação no licor negro”. Este estudo foi a base de trabalhos de investigação que foram realizados posteriormente e que conduziram a teses de mestrado.

Em janeiro de 1998 com o ingresso na carreira de Técnico Superior como estagiária, após concurso geral de ingresso, as funções exercidas e resultantes do conteúdo funcional do cargo, inicialmente como Técnica e, posteriormente, como Técnica Superior, abrangeram atividades no âmbito administrativo, técnico-científico de apoio ao ensino e investigação, prestação de serviços e investigação.

---

<sup>1</sup> Adaptação do Comunicado CRUP – Recomendação de 8 de janeiro de 2011

No âmbito administrativo é de salientar o elevado número de projetos de investigação que decorreram no DCTP, tendo desencadeado diversos procedimentos para a sua melhor organização e execução.

No âmbito técnico-científico de apoio ao ensino e investigação, foi dado apoio a diversas aulas práticas específicas do curso de Eng<sup>a</sup>. do Papel, Eng<sup>a</sup>. Química e Ciências Farmacêuticas. Ainda neste contexto, destaca-se o acompanhamento dos alunos nos Projetos de fim de curso, dando-lhes apoio complementar a todas as atividades desenvolvidas, no domínio tecnológico e de análises físico-químicas. Ainda neste enquadramento, realça-se o manuseamento do equipamento de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (GC-MS), para vários trabalhos de investigação do DCTP, do Departamento de Química (DQ), doutoramentos, projetos de fim de curso e trabalhos de prestação de serviços.

Paralelamente ao desempenho das funções atrás descritas, a participação como membro da equipa de investigação em vários projetos de Investigação Científica e de Desenvolvimento Tecnológico permitiu que transmitisse os conhecimentos e experiência anteriormente adquirida, acompanhando os bolseiros no manuseamento dos equipamentos e no seguimento de técnicas laboratoriais.

Na vertente do desempenho de atividades específicas, destacam-se como mais relevantes a colaboração prestada no estudo e implementação de experiências pedagógicas para as disciplinas de Introdução à Engenharia Química, Engenharia das Reações I e II e Termodinâmica Química. Na colaboração que prestei no planeamento e implantação dos equipamentos no Centro de Investigação em Ciência e Tecnologia do Papel, com especial ênfase para a máquina de papel.

O DCTP sempre manteve uma colaboração muito próxima com a indústria. Nesta colaboração, a indústria solicitava, para além de trabalhos pontuais, estudos de investigação aplicados. Para estes estudos, salienta-se a realização dos trabalhos laboratoriais e posterior elaboração de relatórios ou fichas de resultados.

Em 2007 a TECNICELPA galardoou, com o prémio Tecnicelpa, um artigo científico para o qual colaborei. Este prémio tem o intuito de estimular a produção de trabalhos técnico-científicos nas Empresas, Universidades e Institutos de Investigação que desenvolvem a sua atividade em áreas da Floresta, da Pasta e do Papel. Com este prémio, a comunidade empresarial reconheceu o trabalho de investigação que se desenvolve na UBI.

Do trabalho descrito resultaram várias publicações, das quais se destacam três artigos publicados em revistas científicas internacionais com arbitragem científica.

Em fevereiro de 2010 deu-se uma alteração significativa no trajeto profissional com a colocação na Faculdade de Ciências (FC), como Secretária Geral da Faculdade. Este cargo tenho como função principal a gestão administrativa e financeira dos Departamentos, dos projetos de investigação e das Unidades de Investigação e Desenvolvimento que decorrem na FC; a instrução dos processos de aquisição de bens e serviços; a instrução (financeira e documental) dos processos de deslocações; a informação da elegibilidade, legalidade e dotação das despesas; prestando ainda apoio e diversos esclarecimentos relativamente aos processos e respetivos procedimentos que decorrem na Faculdade. Toda esta atividade é desenvolvida, conjuntamente, com os Serviços Administrativos, o Instituto Coordenador de Investigação, os docentes, os investigadores e o pessoal técnico e administrativo.

O percurso académico, científico e profissional encontra-se descrito com detalhe no *Curriculum Vitae* apresentado a seguir.

# Índice

<i>Curriculum Vitae</i>	1
1 - Dados Biográficos	2
2 - Habilitações Literárias	2
3 - Habilitações Profissionais	2
4 - Atividades Profissionais	3
5 - Prestações de Serviços	6
6 - Membro da Comissão Organizadora	7
7 - Participação em Projetos de Investigação Científica e de Desenvolvimento Tecnológico como membro da equipa de investigação	7
8 - Formação Profissional	8
8.1 - Estágios	8
8.2 - Cursos de Formação	8
8.3. - Participação em Seminários e Congressos	9
9 - Publicações	11
9.1 - Artigos em Revistas Científicas Internacionais com Arbitragem Científica (indexados à base de dados ISI Web of Knowledge)	11
9.2 - Publicações em Revistas Nacionais com Arbitragem Científica	11
9.3 - Publicações em Revistas Nacionais sem Arbitragem Científica	11
9.4 - Publicações em atas de congressos internacionais	11
9.5 - Publicações em atas de congressos nacionais	12
9.6 - Livros de actas de Congressos Nacionais sem Arbitragem Científica	12
10 - Prémios	13
Anexos	

# *Curriculum Vitae*

---

## 1 - Dados Biográficos

**Nome:** Cristina Maria dos Santos Gil Passos

**Data de Nascimento:** 2 de setembro de 1968

**Naturalidade:** Guarda

**Filiação:** João Marques Pires Gil e Maria da Luz Rocha Santos

**Estado Civil:** Casada, duas filhas

**Residência:** Rua Cidade de Gouveia, N° 9, 3° D<sup>to</sup>, 6300-535 Guarda

## 2 - Habilitações Literárias

Obteve o Bacharelato em Engenharia Química Industrial, variante Tecnologia de Celulose e Papel, no Instituto Politécnico de Tomar, em março de 1990, com a classificação final de treze valores.

Licenciou-se em Química Industrial, na Universidade da Beira Interior, em outubro de 1996, com a classificação final de treze valores. No âmbito do projeto de fim de curso apresentou o trabalho intitulado “Estudo da variação da composição química da madeira de *Eucalyptus Globulus* no processo Kraft e dos produtos de degradação no licor negro”, classificado com Muito Bom (dezoito valores).

## 3 - Habilitações Profissionais

Foi docente da disciplina de Físico-Química na Escola Secundária de Trancoso, no ano letivo de 1989/1990 e na Escola Secundária Campos Melo, no ano letivo de 1990/1991.

Em 4 de março de 1993 ingressou na carreira técnica na UBI, como Técnica Estagiária, posição que manteve até outubro de 1994. A essa data, foi promovida a Técnica de 2ª Classe, posição que ocupou até janeiro de 1998. Posteriormente, e após ter prestado provas, desempenhou as funções de Técnica Superior Estagiária, entre janeiro de 1998 e maio de 1999, e de Técnica Superior de 2ª Classe, de maio de 1999 a julho de 2004. Desde julho de 2004, exerce as funções de Técnica Superior de 1ª Classe.

## **4 - Atividades Profissionais**

Desde o seu ingresso na carreira Técnica na UBI e até janeiro de 2010, exerceu a sua atividade profissional no Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel. Desde fevereiro de 2010, e como Técnica Superior de 1ª Classe, exerce funções de Secretária Geral da Faculdade de Ciências. As tarefas desempenhadas ao longo da sua permanência na Carreira Técnica na UBI descrevem-se, em seguida, com mais detalhe.

### **Março de 1993 a janeiro de 2010**

Durante este período, a signatária foi responsável por tarefas de gestão, que incluíam a organização e controlo das verbas do DCTP, tendo realizado consultas a fornecedores e processamento da aquisição de material de laboratório, de reagentes, de material informático e de equipamentos que decorreram no DCTP. Em relação à aquisição de equipamentos, elaborou os processos de concurso, com os respetivos cadernos de encargos, programa de concurso e análise de propostas.

Ainda no âmbito da gestão departamental, elaborou os planos e os relatórios de atividades do DCTP. Foi ainda responsável pela elaboração da Auto-Página do DCTP para inclusão na página da Internet da UBI.

No período em apreço, desempenhou as suas funções, nos laboratórios de Microscopia, Análises Químicas, Investigação Química e Tecnologia Química, Tecnológico de Pasta, Papel e Transformação, Ensaios Físicos e Impressão e Centro Tecnológico do Papel, do DCTP, das quais se destacam as seguintes:

- Foi responsável pela operacionalidade e pelo bom funcionamento dos equipamentos de ensaios físicos ao papel e de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) e pela calibração do aparelho de medição das características biométricas das fibras (MorFi).
- Elaborou dossiers dos equipamentos existentes no DCTP, nos quais constam a ficha técnica, o manual de utilização e as normas a usar nos ensaios.
- Realizou análises no equipamento de GC/MS para trabalhos de investigação dos departamentos de Ciência e Tecnologia do Papel e de Química, para projetos de fim de curso e na prestação de serviços para o exterior da UBI.
- Acompanhou os trabalhos de investigação desenvolvidos pelos docentes do DCTP para a obtenção do grau de Mestre e de Doutor, em particular os trabalhos de doutoramento do Engº Álvaro Vaz.

Nos projetos em que o DCTP e os seus docentes estiverem envolvidos, foi responsável pela sistematização dos seus processos administrativo-financeiros, visando o controlo das verbas. Para além disso, desempenhou várias tarefas de investigação e/ou apoio à investigação, nomeadamente:

- Realizou, anualmente, os ensaios físicos em papel e o tratamento estatístico dos resultados, no âmbito do programa de intercomparação laboratorial com a Relacre.
- Colaborou no planeamento e implantação dos equipamentos para a criação do Centro de Investigação em Ciência e Tecnologia do Papel, com principal incidência na instalação da máquina piloto de papel, tendo efetuado formação para o seu manuseamento.
- No que diz respeito aos projetos Praxis e POCTI, que decorreram no DCTP, contribuiu com os seus conhecimentos e experiência na parte experimental, acompanhando os Bolseiros de Iniciação à Investigação no manuseamento dos equipamentos e seguimento de técnicas laboratoriais.
- Colaborou na elaboração dos relatórios de execução financeira, de progresso e finais, de projetos de I&D no âmbito dos programas comunitários STRIDE e ENVIRONMENT, dos projetos do Programa POCTI e Praxis XXI.
- Efetuou a gestão orçamental, com elaboração de relatórios e documentos diversos do Projeto “Produção de biocombustíveis a partir de resíduos florestais” Fundo Florestal Permanente-IFADAP 2006.09.001055.
- Elaborou os relatórios de atividades e planos de atividades do Grupo de Papel, da Unidade de I&D Materiais Têxteis e Papeleiros.
- Acompanhou e apoiou os investigadores da Faculté des Sciences de Sfax, Tunisia, que se deslocaram ao DCTP no âmbito do projecto “Composite materials based on cellulosic fibres modified by chemical surface treatments”, ao abrigo do Programa de Cooperação Científica e Tecnológica Luso-Tunisina.

Ainda durante este período, deu apoio às aulas lecionadas pelos docentes do DCTP, destacando-se:

- O apoio às aulas práticas das disciplinas específicas dos cursos de Engenharia do Papel e Engenharia Química e a algumas aulas práticas do curso de Ciências Farmacêuticas.
- A colaboração no estudo e implementação de experiências pedagógicas para as disciplinas de Introdução à Engenharia Química, Engenharia das Reacções I e II e Termodinâmica Química do curso de Engenharia Química.
- Paralelamente, apoiou e acompanhou outras ações que decorreram no DCTP, nomeadamente:

- Apoio aos alunos que desenvolveram projeto de fim de curso, Mestrado e Doutoramento no DCTP, com especial destaque nos trabalhos de Mestrado da Eng<sup>a</sup>. Susana Fernandes.
- Apoio e acompanhamento, nos trabalhos laboratoriais, aos alunos dos programas Socrates e Erasmus.
- Orientação de um estagiário, de julho de 1999 a abril de 2000, no âmbito do programa Emprego-Vida. Com este estagiário, procedeu ao levantamento de toda a bibliografia existente no DCTP, informatizando toda a informação e criando uma Biblioteca, onde implementou um expositor de revistas, facilitando a sua consulta e movimentação.
- Ter sido responsável pelo acompanhamento de duas ações do Programa Ciência Viva nas Férias/2000: A primeira ação, intitulada “Da madeira até ao papel”, que decorreu de 3 a 31 de julho, sendo o grupo constituído por duas alunas do 11ºano; A segunda ação, intitulada “Reciclagem do papel velho”, que decorreu de 1 a 15 de setembro, sendo o grupo constituído por dois alunos do 10º ano. Para além destas ações acompanhou outros alunos, no âmbito do mesmo programa, em diferentes anos.
- Participação no acompanhamento de grupos de alunos que, com frequência, visitavam o DCTP. Nestas visitas proporcionava aos visitantes uma visão geral do processo de fabrico de pasta e papel, complementada com demonstrações experimentais.
- Colaboração, em todas as atividades de divulgação da UBI para a comunidade, através dos “Dias da UBI”.

## **Fevereiro de 2010 a junho de 2012**

Após a integração do departamento de Ciência e Tecnologia do Papel no departamento de Química, em 2009, a signatária foi integrada neste último departamento, tendo, em fevereiro de 2010, passado a integrar a direção da Faculdade de Ciências, como sua Secretária Geral. Nessas funções, tem desempenhado as seguintes tarefas:

- Controlo financeiro das despesas da Faculdade de Ciências - Implementação de medidas de controlo financeiro das despesas dos Departamentos, Unidades e Projetos de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico.
- Gestão administrativa das Unidades e Projetos de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico.
- Instrução financeira e documental dos processos de deslocações.
- Instrução dos processos de aquisição de bens e serviços, com a informação da elegibilidade, legalidade e dotação das despesas.

- Elaboração do processo de contratação de bolsеiros, desde a abertura de concurso à contratação.
- Preparação dos processos dos concursos para aquisição de bens com vista à sua inclusão na plataforma eletrónica de Contratação Pública.
- Controlo e conferência dos relatórios semestrais das Unidades de Investigação.
- Controlo e verificação dos pedidos de pagamento de acompanhamento dos Projetos de Investigação.
- Elaboração dos planos e relatórios de atividades da Faculdade de Ciências.
- Secretariou a reunião do Conselho Geral da UBI, 30 de março de 2012.

## 5 -Prestação de Serviços

No âmbito da prestação de serviços a empresas, realizou diversos trabalhos laboratoriais, nomeadamente para o Banco de Portugal, Alumínio Português, Portucel Tejo, SGS, Biofun, Consultor Técnico da Companhia de Celulose do Caima, BASF, Banco Totta & Açores, GLV Pulp & Paper, Leaderpack, Contiforme, Lifresca, Renova, Formoprinte, Portucel Viana e Celtejo, que a seguir se descrevem:

**Banco de Portugal** - de agosto a setembro de 1993, no âmbito de um protocolo entre a UBI e o Banco de Portugal, participou no desenvolvimento de um trabalho de investigação sobre características de resistência em novos sistemas de segurança no papel para notas.

**Portucel Tejo** - de maio de 1993 a julho de 1994, no âmbito de um contrato entre a UBI e a Portucel Tejo, participou num projeto com vista ao melhoramento da qualidade da pasta crua de pinho e à otimização das características tecnológicas do processo fabril. Ainda para esta empresa, desenvolveu vários trabalhos experimentais, designadamente estudos de aptidão de diferentes matérias-primas para o processo de pasta crua. Para estes estudos realizou vários cozimentos de diferentes espécies de pinho, tendo, posteriormente, procedido à caracterização físico-mecânica das pastas obtidas. Para além destes trabalhos, realizou também vários estudos de permeabilidade das pastas fabris.

**MAPRIL** - em fevereiro de 1997, no âmbito de um convénio entre a UBI e a Mapril, participou num projeto que visava a aplicação de uma resina para conferir propriedades de resistência em húmido ao papel.

**MAPRIL/RAZIO** - participou num estudo laboratorial com o objetivo de estudar a “Eficiência de colagem de diferentes dímeros de alquil ceteno (AKD)”, produzidos por esta empresa e “Otimizar as condições de adição dos AKD”.

**Biofun** - de outubro de 1997 a março de 1998, realizou o estudo quantitativo do principal composto responsável pelo aroma de maçã, em diferentes amostras de concentrado de maçã. Este trabalho consistiu num tratamento químico e posterior análise por GC/MS.

**BASF** - de novembro a dezembro de 1998, participou no desenvolvimento de um trabalho que tinha como objetivo produzir papéis anisotrópicos com uma estabilidade dimensional compreendida entre 0,3 e 0,5% no sentido transversal. Para a sua concretização, foram utilizados diferentes tipos de pasta e produtos auxiliares para as amostras produzidas no formador dinâmico.

**Portucel Setúbal** - colaborou no trabalho de investigação para a identificação e quantificação de alguns depósitos no papel. Conjuntamente com o Centro de Óptica, procedeu à identificação de alguns problemas derivados dos “missing dots” e “streaks”.

**Portucel Viana** - de maio a setembro de 2003, no âmbito de um contrato entre a UBI e a Portucel Viana, participou num projeto de investigação que visava estudar “O efeito da diminuição da temperatura de cozimento sobre as características da pasta”, o “Efeito da taxa de incorporação de fibra secundária sobre as características do papel laboratorial” e elaborar a “Análise de duas amostras de pinho (com casca e aparas do exterior)”.

**Celtejo** - de janeiro a março de 2006, participou no trabalho de investigação para a otimização das sequências de branqueamento de pasta kraft de pinho.

## **6 - Membro da Comissão Organizadora**

Foi membro da Comissão Organizadora dos seguintes eventos:

- “Dias da U.B.I”, realizados nos dias 3, 4 e 5 de fevereiro de 1998.
- “XVI Encontro Nacional da Tecnicelpa”, realizado nos dias 29, 30 e 31 de outubro de 1998 na UBI
- “Dias da U.B.I”, realizados nos dias 13, 14 e 15 de março de 2001.
- Conferência “Ciência na Universidade e nas Escolas: Pontos de Encontro”, realizada no dia 26 de novembro de 2011, pela Faculdade de Ciências, na UBI.

## **7 - Participação em Projetos de Investigação Científica e de Desenvolvimento Tecnológico como membro da equipa de investigação**

- Unidade de Investigação & Desenvolvimento Materiais Têxteis e Papeleiros-Nº 195.
- “Produção de pasta para aplicações especiais a partir do pinho nacional” Praxis XXI-3/3.2/PAPEL/2325/95.

- “Estudo da contribuição do revestimento nas propriedades dos papéis revestidos” Praxis XXI- 3/3.2/PAPEL/2318/95.
- “Caracterização por técnicas óticas de folhas de papel como uma estrutura multilaminar” Praxis XXI- 3/3.2/PAPEL/2316/95.
- “O factor de formação da folha e a qualidade do papel” Praxis XXI- 3/3.2/PAPEL/2312/95.
- “Centro de investigação em ciência e tecnologia do papel” Praxis XXI- 1/1.1/PAPEL/1678/95.
- “Impulse drying -High temperature pressing of fibrous materials” JOULE III -JOE 3CT97 0078
- “Valorização do lenho de acácia produzido em Portugal. Potenciais utilizações” POCTI/42594/AGR/2001.

## **8 - Formação Profissional**

### **8.1- Estágios**

setembro de 1988 - Estágio no laboratório do Centro Fabril de Ródão (Portucel Tejo), na área do controlo do processo de fabricação de pasta.

novembro de 1989 - Estágio na fábrica de Papel do Almonda - Renova, na área dos processos de fabricação de papel.

### **8.2- Cursos de Formação**

Curso avançado de “ Cromatografia de gases ”, ministrado na Soquímica, Lisboa, de 22 a 24 de março de 1994.

- “Controlo de qualidade aplicado a Laboratórios Universitários ”, ministrado no Centro de Óptica da UBI, pelo Prof. Doutor Luis Roldan, de 15 a 20 de julho de 1996, com a duração de 20 horas.
- “Código do Procedimento Administrativo: teoria e prática”, ministrado pelo INA, na UBI, de 21 a 25 de outubro de 1996, com a duração de 30 horas.
- “A Folha de Cálculo Excel ”, ministrado pelo INA, na UBI, de 24 a 28 de fevereiro de 1997, com a duração de 30 horas.
- “A dimensão comportamental da liderança”, ministrado pelo Sindicato dos Quadros Técnicos do Estado, no Centro de Formação do Hospital Cova da Beira, de 9 a 12 de abril de 2002, com a duração de 24 horas.

- “Conceção e escolha de projetos ”, ministrado pelo Sindicato dos Quadros Técnicos do Estado, na UBI, de 17 a 21 de março de 2003, com a duração de 30 horas.
- “Internet-utilização (Internet Explorer)”, ministrado pelo Sindicato dos Quadros Técnicos do Estado, na UBI, de 12 a 13 de maio de 2003, com a duração de 12 horas.
- “Contabilidade Pública”, ministrado pela SCALCONSULT, na UBI, de 2 a 30 de outubro de 2003, com a duração de 30 horas.
- “LabVIEW Basic I”, ministrado pela National Instruments, em Lisboa, de 5 a 7 de abril de 2004.
- “Negociação e gestão de contratos de I&D Europeus”, ministrado pela Consultora Depaex-Desarrollo, Estudios, Promocion y Analisis de Extremadura, na UBI, de 6 a 7 de outubro de 2004.
- “Folha de cálculo excel avançado”, ministrado pela SCALCONSULT, na UBI, de 03 a 12 de novembro de 2004, com a duração de 18 horas, tendo obtido a classificação final de Excelente.
- “O novo regime de avaliação do desempenho”, ministrado pelo Sindicato dos Quadros Técnicos do Estado, na UBI, no dia 26 de novembro de 2004.
- “A base de dados Access (1ª. Acção), no âmbito do POAP, na UBI, de 02 a 09 de novembro de 2006, com a duração de 24 horas, com aprovação.
- “Powerpoint-Acção 1 e 2”, no âmbito do Projecto FORMINOV, POS-Conhecimento, na UBI, de 05 a 19 de novembro de 2007, com a duração de 20 horas, tendo obtido a classificação de Bom.
- “7º Programa Quadro-Ferramentas Informáticas Associadas”, no âmbito do Projecto FORMINOV, POS-Conhecimento, na UBI, de 19 a 20 de novembro de 2007, com a duração de 20 horas, tendo obtido a classificação de Bom.
- “Aplicação do Microsoft Project à Gestão de Projectos”, ministrado pelo Sindicato dos Quadros Técnicos do Estado, na UBI, de 10 a 13 de novembro de 2009, com a duração de 24 horas.
- “Gestão e Aprovisionamento de Compras”, na UBI, de 15 de junho a 7 de julho de 2010, com a duração de 24 horas, tendo obtido a classificação final de Muito Bom.
- “GDUBI-Gestão Documental da UBI”, na UBI, no dia 19 de outubro de 2010, com a duração de 3,5 horas.

- “O trabalho do Júri e respetiva harmonização com a Plataforma Eletrónica, na UBI, no dia 25 de outubro de 2010.
- “Novo Regime dos Contratos de Trabalho em Funções Públicas“, na UBI, no dia 18 de dezembro de 2010, com a duração de 7 horas.
- “Novo Modelo Gestão de Recursos Humanos“, na UBI, de 25 a 26 de fevereiro de 2011, com a duração de 14 horas.
- “Código dos Contratos Públicos na aquisição de Bens e Serviços“, ministrado pelo Sindicato dos Quadros Técnicos do Estado, na Covilhã, de 25 a 27 de maio de 2011.
- “Comunicação Protocolo e Relações Públicas: Protocolo e Organização de Eventos“, na UBI, de 4 a 5 de julho de 2011, com a duração de 14 horas.
- “Código dos Contratos Públicos“, na UBI, de 18 a 22 de novembro de 2011, com a duração de 18 horas.
- “Contabilidade e Técnicas Orçamentais“, na UBI, de 9 a 31 de janeiro de 2012, com a duração de 25 horas, tendo obtido a classificação final de 19 valores.
- “Construção de Quar e definição de objetivos“, na UBI, de 18 a 20 de janeiro de 2012, com a duração de 18 horas, tendo obtido a classificação final de 18 valores.

### **8.3- Participação em Seminários e Congressos**

- X Encontro Nacional da Tecnicelpa, Viana do Castelo, março de 1989.
- Seminário apresentado pelos Engos Bengt Kallstron e Horst Gunter, da empresa Lorentzen & Wettre (Suécia) com a participação da Elnor, “Novos métodos para controlo de qualidade em papel, cartão e embalagem“, UBI, 27 de maio de 1994.
- Workshop “Novos desenvolvimentos nas tecnologias da pasta e papéis“, pela Coimpassa Portuguesa, UBI, 25 de novembro de 1994.
- 1as Jornadas Nacionais de Química Industrial, UBI, de 22 a 24 de março de 1996.
- 1as Jornadas de Eng<sup>a</sup> do Papel, UBI, de 20 a 22 de maio de 1997.
- XVI Encontro Nacional da Tecnicelpa, UBI, outubro de 1998.
- Várias conferências proferidas pelo Prof. Doutor Jacques Silvy, sobre “Estrutura e Propriedades do Papel“, UBI, 1998 e 1999.
- Seminário “Prevenção de riscos na utilização e manuseamento de produtos químicos perigosos“, Direcção Geral de Energia, Lisboa, 9 de maio de 2000.

- Seminários no âmbito das “Aulas Abertas” do Programa Socrates: “Acid sizing vs. Neutral/alkaline sizing”, “Control of white water chemistry in closed papermaking system”, “Modular design of plant for wastepaper processing” e “Seminar on charge measurement in papermaking”, apresentados pela Prof<sup>a</sup>. Doutora Elena Bobu, da Universidade Gh. Asachi de Iasi (Roménia), UBI, 27 e 28 de junho de 2001.
- Seminário apresentado pela Prof<sup>a</sup>. Doutora Danielle Robert do C.R.M.V. (Universidade Joseph Fourier Grenoble), “NMR spectroscopy as a tool to investigate lignins structures: overview and recent development”, UBI, 27 de fevereiro de 2004.
- Seminário “A industria de pasta e papel - um potencial a explorar”, com a participação do Eng<sup>o</sup> Serafim Tavares, o Eng<sup>o</sup> Armando Brochado e o Eng<sup>o</sup> Paulo Barata, UBI, 1 de junho de 2007.
- XX Encontro Nacional da Tecnicelpa, Tomar, 10, 11 e 12 de outubro de 2007.
- Seminário apresentado pela Eng<sup>a</sup>. Ana Paula Castelo Branco, Directora do Departamento de Qualidade da Holding Higifarma, “Gestão da Qualidade - ISO 9001”, UBI, 31 de março de 2008, com a duração de 4 horas.
- Seminário apresentado pelo Prof. Doutor Naceur Belgacem da E.F.P.G.de Grenoble, “Biorefinery using vegetable biomass”, UBI, 23 e 24 de abril de 2009, com a duração de 10 horas.
- Seminário apresentado pelo Prof. Doutor Naceur Belgacem da E.F.P.G.de Grenoble, “Surface phenomena and adhesion”, UBI, 27, 28 e 29 de abril de 2009, com a duração de 10 horas.
- Seminário realizado pela Soquímica, “7000A Triplo Quadrupolo GC/MS e as potencialidades da HPLC de rápida resolução (RRLC) e o seu acoplamento a sistemas de LC-MS e LC-MS/MS (QqQ)”, UBI, 13 de maio de 2009, com a duração de 3 horas.

## 9- Publicações

### 9.1- Artigos em Revistas Científicas Internacionais com Arbitragem Científica (indexados à base de dados ISI Web of Knowledge)

Na lista de artigos que se segue indicam-se, entre parênteses, o número de citações (NC) e o factor de impacto (IF).

- D. Andrade, C. Gil, L. Breitenfeld, F.C. Domingues, A.P. Duarte (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.. *Industrial Crops and Products*, 30, 165-167. (NC-7; IF-2.103).

- N. Gil, C. Gil, M.E. Amaral, A.P. Costa, A.P. Duarte (2009). Use of enzymes to improve the refining of a bleached Eucalyptus globulus kraft pulp. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 89-95. (NC-8; IF-2.193).
- A Luís, F. Domingues, C. Gil, A.P. Duarte (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp., *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 886-893. (NC-3; IF-0.598).

## **9.2-Publicações em Revistas Nacionais com Arbitragem Científica**

- P. Baptista, C. Gil, M.E. Amaral, F.C Domingues, A.P. Duarte (2008). Antioxidant activity of forest residues extracts. *Revista Portuguesa de Farmácia*, Vol. LII, nº3 (suplemento), 1º Encontro Nacional de Química Terapêutica, ISSN:0484-811X, 62, 13-15 novembro, Porto.

## **9.3-Publicações em Revistas Nacionais sem Arbitragem Científica**

- N. Gil, C. Gil, M. E. Amaral, A. P. Costa, A P. Duarte (2007). Biorefinação-uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de Eucalyptus globulus, *Pasta e Papel*, dezembro 2007, 38-43.
- J. Curto, C. Gil, E. Conceição, A. Portugal, R. Simões (2009). Estudo comparativo da incorporação de fibra de Pinus pinaster branqueada no papel de Eucalyptus globulus, *Pasta e Papel*, Verão 2009, 52-57.

## **9.4- Publicações em Atas de Congressos Internacionais**

- E. Rubio, C. Gil, A P. Duarte, N. Belgacem (1998). Residual lignin of unbleach kraft pulps from Pinus Pinaster: Isolation and characterization. *Proceedings of the Chemical Technology of Wood Pulp and Paper Conference*, 300-305, 23-25 June, Bratislava, Slovaquie.
- A. Vaz, C. Gil, R. Simões, J. Silvy (2006). The effect of shear rate on apparent viscosity for different pulp suspensions, *5th International Conference on Mechanics and Materials in Design*, 329-330, 24-26 julho 2006, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.
- P. Baptista, C. Gil, M.E. Amaral, F. Domingues, A.P. Duarte (2008). Influence of extraction conditions on flavonoid yields from different Portuguese forest residues, *Proceedings of chempor 2008 - 10th International Chemical and Biological Engineering Conference*, ISBN:978-972-97810-4-9862-863, 4-6 setembro 2008, Universidade do Minho, Portugal.

## 9.5-Publicações em Atas de Congressos Nacionais

- C. Gil, M. E. Amaral, M. Tavares, R. Simões (1999). Estudo do potencial papeleiro da acácia spp., 1º Encontro sobre Invasoras Lenhosas, 171-178, 16-18 novembro 1999, Gerês, Portugal.
- S. Fernandes, C. Gil, A.P. Duarte (2005). Influência da concentração de PCC, do pH e da Temperatura na Colagem Interna com ASA em pastas de *Eucalyptus globulus* ENGENHARIA'2005 - Inovação e Desenvolvimento, 6 p. em CD-ROM, 21-23 novembro 2005, Covilhã, Portugal.
- N. Gil, C. Gil, M. E. Amaral, A. P. Costa, A. P. Duarte (2007). "Biorefinação- Uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*", XX Encontro Nacional da Tecnicelpa, 135-141, 10-12 outubro 2007, Tomar, Portugal.
- J. Curto, C. Gil, E. Conceição, A. Portugal, R. Simões (2007). Estudo comparativo da incorporação de fibra de *Pinus pinaster* branqueada no papel de *Eucalyptus globulus*, XX Encontro Nacional da Tecnicelpa, 29-35, 10-12 outubro 2007, Tomar, Portugal.
- D. Gonçalves, C. Gil, A. P. Duarte, M. E. Amaral (2007). Influência do tratamento enzimático na biorefinação de uma pasta de *Pinus pinaster* ao sulfato não branqueada, in Engenharias'07-Inovação & Desenvolvimento, Covilhã, 21-23 novembro 2007, Covilhã, Portugal.
- D. Andrade, C. Gil, F.C. Domingues, L. Breitenfeld, A. P. Duarte (2008). *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. as sources of bioactive compounds, Livro de resumos do XVI Congresso Nacional de Bioquímica, P08, 22-26 novembro 2008, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, Portugal.
- P. Baptista, C. Gil, M.E. Amaral, F.C. Domingues, A.P. Duarte (2008). Antioxidant activity of forest residues extracts. *Revista Portuguesa de Farmácia*, Vol. LII, nº3 (suplemento), 1º Encontro Nacional de Química Terapêutica, 62, 13-15 novembro, Porto, Portugal.

## 9.6-Livros de Atas de Congressos Nacionais sem Arbitragem Científica

- A. Luís, F. Domingues, C. Gil, A. P. Duarte (2009). Antioxidant activity of ethanolics and aqueous extracts of forest shrubs, Seminário Indústria Têxtil e Papeleira, Actas do Simpósio 2009 - Indústria Têxtil e Papeleira: Ensino e Investigação que Futuro?, ISBN:978-989-654-048-7, 3-4 dezembro 2009, Covilhã, Portugal.

## 10 - Prémios

Prémio Tecnicelpa 2007 com a comunicação:

- N. Gil, C. Gil, M. E. Amaral, A. P. Costa, A. P. Duarte (2007). “Biorefinação- Uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*”, XX Encontro Nacional da Tecnicelpa, 135-141, 10-12 outubro 2007, Tomar, Portugal.

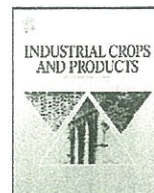
*Anexos*

---

## *Anexo I*

---

D. Andrade, C. Gil, L. Breitenfeld, F.C. Domingues, A.P. Duarte (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.. *Industrial Crops and Products*, 30, 165-167.



# Industrial Crops and Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## Short communication

### Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.

Daniela Andrade<sup>a</sup>, Cristina Gil<sup>a</sup>, Luiza Breitenfeld<sup>b</sup>, Fernanda Domingues<sup>a</sup>, Ana Paula Duarte<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Unit of Textile and Paper Materials, Covilhã, Portugal

<sup>b</sup> Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 21 November 2008

Received in revised form 18 January 2009

Accepted 21 January 2009

##### Keywords:

*Cistus ladanifer*

*Arbutus unedo*

Phenolic content

Flavonoid content

Antioxidant activity

Cell viability

#### ABSTRACT

The ethanol and acetone/water extracts of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. were characterised concerning the total phenolic and flavonoid contents, presenting relatively high values when compared with other species described in the literature. The antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method in terms of EC<sub>50</sub>, using trolox as standard reference. The extracts of both species showed scavenging activity for the DPPH radical.

Extracts bioactivities were also tested by the evaluation of the viability effects on human fibroblasts primary culture cells. Viability studies were performed by MTT method. Both extracts are bioactive; *C. ladanifer* extracts were associated with an inhibitory effect and *A. unedo* L. were associated with an induced effect on cells viability.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The forest area in Portugal covers around 38% of the territory and represents a large quantity of forestry residues, where one can include the shrub species. These plants can be used as raw material for achieving high value chemicals, like bioactive compounds. This work is a part of a project that intends to produce ethanol from this lignocellulosic biomass, according to the biorefinery concept. The present work deals with the characterisation of ethanol and acetone/water extracts of *Cistus ladanifer* (rock-rose) and *Arbutus unedo* L. (strawberry tree), which are characteristic shrub species of the Mediterranean region.

*C. ladanifer* is widely distributed over Iberian Peninsula and is an important aromatic plant used in the perfumery industry. The essential oil extraction and composition are well documented in the literature (Mariotti et al., 1997; Ramalho et al., 1999; Teixeira et al., 2007). Moreover, this plant is rich in flavonoids, in special in its exudate, which composition is described by several authors (Chaves et al., 1998; Sosa et al., 2004, 2005).

The leaves of *A. unedo* are used in folk medicine to treat several diseases (Ziyyat et al., 1997) and the use of this plant in the prevention or treatment of platelet aggregation linked to arterial hypertension was supported by results of some research works (Mekhfii et al., 2006; Haouari et al., 2007). Several com-

pounds, including polyphenols, have been isolated from *A. unedo* hydroalcoholic extracts (Fiorentino et al., 2007) and an antioxidant activity was demonstrated in their ethanolic and methanolic extracts (Pabuçcuoglu et al., 2003).

Among the bioactive compounds present in plants, polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities (Noferi et al., 1997; Ren et al., 2003; Pizzi, 2008).

Fibroblasts are mesenchymal cells with many vital functions during development and in adult organisms. They are among the most accessible normal mammalian cell types and are used as a model for cancer initiation and progression mechanisms. Human skin fibroblasts are target cells for flavonoids (Bhowmick et al., 2004).

In the present study, the antioxidant activity of *C. ladanifer* and *A. unedo* acetone and ethanolic extracts were evaluated by the DPPH method. The results were compared with an antioxidant standard, trolox. In addition, the flavonoid and total phenolic contents were determined by colorimetric methods. The effects of the extracts on human fibroblasts primary culture cells were also evaluated.

## 2. Materials and methods

The shrubs were collected in May 2007 and stored at room temperature during six months. All plants consisted of wood/stalks, bark and leaves and were milled in a Retsch cutting mill to a particle size between 0.180 mm and 0.500 mm. The solvent extractions were carried out by refluxing plant samples during 2 h with ace-

\* Corresponding author at: Department of Paper Science and Technology, Universidade da Beira Interior, Av. Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal. Tel.: +351 275319792; fax: +351 275319740.

E-mail address: [apcd@ubi.pt](mailto:apcd@ubi.pt) (A.P. Duarte).

**Table 1**  
Characterisation and yields of ethanolic and acetone extracts from *C. ladanifer* and *A. unedo*.

Sample		Extract yield (% w/w)	Total phenolic content (mg GAE/g plant extract) <sup>a</sup>	Flavonoid content (mg QE/g plant extract) <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>b</sup>
<i>Cistus ladanifer</i>	Ethanol extract	8.49	255.19 ± 7.12	20.50 ± 0.77	7.85
	Acetone extract	14.19	334.46 ± 31.83	23.37 ± 0.67	39.51
<i>Arbutus unedo</i> L.	Ethanol extract	10.04	254.50 ± 4.60	30.30 ± 1.62	21.20
	Acetone extract	20.57	328.58 ± 33.36	20.70 ± 0.41	26.00
Trolox	-	-	-	-	16.88

<sup>a</sup> Each value was obtained by calculating the average of three experiments ± standard deviation.

<sup>b</sup> Concentration of sample required to scavenge 50% of DPPH free radicals.

tone/water 60:40 and ethanol 95% as solvents. The plant/solvent ratios were 1:20 and 1:10, respectively. The extract solutions were filtered and distilled in vacuum to yield the extract.

Flavonoids were determined by aluminium chloride colorimetric method using quercetin for the preparation of the standard calibration curve (Pourmorad et al., 2006). Quantitative measures were performed based on a standard calibration curve of eleven points (0–200 mg/mL) (standard curve equation:  $y = 0.0011x$ ,  $r^2 = 0.9946$ ). The flavonoid content was expressed as quercetin equivalents (QE) in mg/g of dry extract. Total phenolic content was estimated by the Folin–Ciocalteu colorimetric method, based on the method described by Tawaha et al. (2007) using gallic acid as standard phenolic compound. The standard calibration curve was prepared using eleven gallic acid concentrations (0–700 ppm) (standard curve equation:  $y = 0.0010x$ ,  $r^2 = 0.9933$ ). The total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents (GAE) in mg/g of dry extract. All determinations were carried out in triplicate.

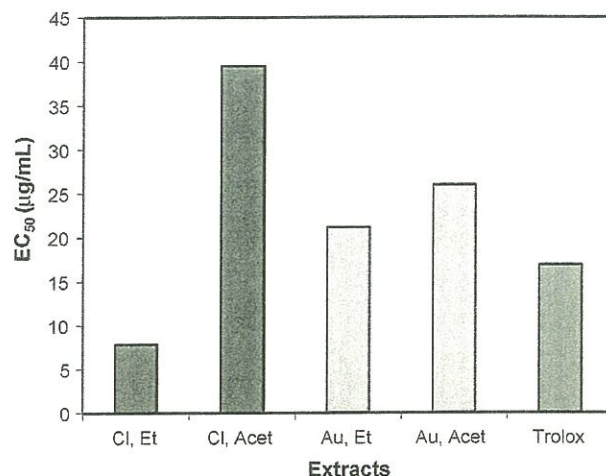
The antioxidant activity was evaluated using the stable 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH) method (Brand-Williams et al., 1995; Sánchez-Moreno et al., 1998). Eight concentrations (12.5–250 μg/mL) of each plant extract were reacted with a methanolic DPPH solution and the kinetics of the reaction was followed. The antioxidant concentration required to inhibit 50% of DPPH free radicals under the experimental conditions (EC<sub>50</sub>) was determined for each plant extract. Trolox was used as standard control. The determinations were carried out in duplicate.

Cell viability was estimated by the MTT assay, which is based on the reduction of a tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenases in viable cells. Human dermal fibroblasts cells used in these experiments, performed in triplicate, were between the fourth and eleventh passages. A dilution of 1:3000 for each crude extract was used in this study and the cell number per well was  $3 \times 10^4$ .

### 3. Results and discussion

The results presented in Table 1 show that *A. unedo* gives rise to higher extract yields and acetone extracts more compounds than ethanol. The total phenolics contents of the extracts in terms of gallic acid equivalents are very similar for both species. The acetone extracts present higher contents than the ethanolic ones, which could be related with the higher quantity of compounds extracted by acetone. The results obtained are very similar to some medicinal plants reported in the literature (Pourmorad et al., 2006; Silva et al., 2007; Liu et al., 2008). Table 1 also shows the flavonoid contents in terms of quercetin equivalents. These values are also very similar among the species, excepting a slight increase in the ethanolic extract of *A. unedo*. In this case, it seems that the type of solvent does not influence the quantity of flavonoids extracted. The flavonoid contents determined in these species are very close to other results found in the literature (Pourmorad et al., 2006; Liu et al., 2008).

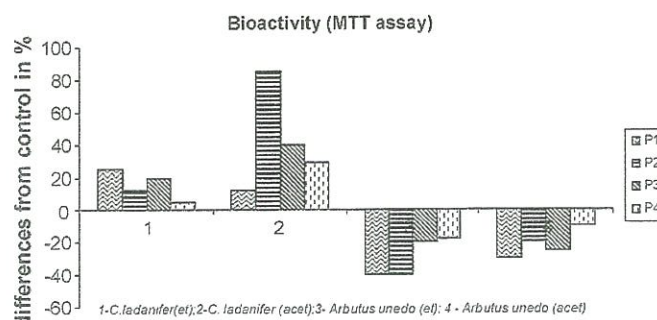
Table 1 and Fig. 1 show the amount of each extract needed for 50% inhibition of the DPPH free radicals (EC<sub>50</sub>). The EC<sub>50</sub> of reference (trolox) is 16.88 μg/mL. The highest radical scavenging activity



**Fig. 1.** EC<sub>50</sub> (μg/mL) values of plant extracts for free radical scavenging activity by DPPH radical. Lower EC<sub>50</sub> indicates higher antioxidant activity. Extracts: Cl,Et—ethanolic *C. ladanifer*, Cl,Acet—acetone *C. ladanifer*, Au,Et—ethanolic *A. unedo*, Au,Acet—acetone *A. unedo*.

was displayed by *C. ladanifer* ethanolic extract (EC<sub>50</sub> = 7.85 μg/mL), which is 2.15 times higher than that of trolox. The other extracts presented antioxidant activities lower than the reference with the lowest antioxidant activity revealed by the *C. ladanifer* acetone extract. According to these results, it does not seem that the content of total phenolics and/or flavonoids is directly and positively correlated with the antioxidant activity, as it is described for other species (Kaur and Kapoor, 2002; Tawaha et al., 2007; Silva et al., 2007; Liu et al., 2008). These results suggest a different composition of ethanolic extract from *C. ladanifer* that is responsible for the high antioxidant activity of this extract, when compared with acetone extract.

Cell viability results (Fig. 2) achieved in four different experiments (P1–P4) show that *C. ladanifer* and *A. unedo* L. extracts



**Fig. 2.** Cell bioactivity of *C. ladanifer* and *A. unedo* L. extracts in human dermal fibroblasts.

displayed bioactivity on human skin fibroblasts. *C. ladanifer* extracts promote cells viability and *A. unedo* L. extracts are associated to decreased cells viability, independently of the solvent used for the extraction. The *A. unedo* L. extracts are able to decrease mitochondrial dehydrogenases activity as MTT assay results had demonstrated, which give rise to certain cytotoxicity. This cell viability decreasing promoted by vegetal extracts was also observed by other authors (Välilmaa et al., 2007), as well as the antioxidant activity and cytotoxicity relationships of polyphenolic fractions of vegetal extracts (Ugartondo et al., 2007).

#### 4. Conclusions

All the studied extracts of lignocellulosic materials were found to be important sources of flavonoids and polyphenols and also showed significant antioxidant activity. The high scavenging capacity revealed by the *C. ladanifer* ethanolic extract may be due to a specific phenolic compound that was extracted by ethanol. Further studies must be realized in order to isolate and identify the chemical compounds that contribute to the total antioxidant activities and to better understand their mechanism as radical scavengers. These studies can lead to the utilization of these species as natural sources of antioxidants compounds. All the studied extracts of both plants were found to alter viability of human dermal fibroblasts cells. The use of these extracts or isolated fractions should be tested and evaluated in different applications needing antioxidant or cytostatic activities.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank *Associação de Produtores Florestais do Paúl* for their kind collaboration on the raw material harvesting and handling. The financial support of this work was provided by the *Fundo Florestal Permanente* within the research contract IFADAP/INGA No. 2006.09.001055.1.

#### References

- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L., 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebns.-Wiss. U.-Technol.* 28, 25–30.
- Chaves, N., Rios, J.J., Gutierrez, C., Escudero, J.C., Olías, J.M., 1998. Analysis of secreted flavonoids of *Cistus ladaniferus* L. by high-performance liquid chromatography–particle beam mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 799, 111–115.
- Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., Mónaco, P., 2007. Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 809–811.
- Haouari, M., López, J.L., Mekhfi, H., Rosado, J.A., Salido, G.M., 2007. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacol.* 113, 325–331.
- Kaur, C., Kapoor, H.C., 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 153–161.
- Liu, H., Qiu, N., Ding, H., Yao, R., 2008. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbs suitable for medical or food uses. *Food Res. Int.* 41, 363–370.
- Mariotti, J.P., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., Bernardini, A.F., 1997. Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France). *Flavour Fragr. J.* 12, 147–151.
- Mekhfi, H., ElHaouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A., 2006. Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. *Phytother. Res.* 20, 135–139.
- Noferi, M., Masson, E., Merlin, A., Pizzi, A., Deglise, X., 1997. Antioxidant characteristics of hydrolysable and polyflavonoid tannins—an ESR kinetic study. *J. Appl. Polymer Sci.* 63, 475–482.
- Pabuçcuoglu, A., Kivçak, B., Bas, M., Mert, T., 2003. Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoterapia* 74, 597–599.
- Pizzi, A., 2008. Tannin: major sources, properties and applications. In: Belgacem, M.N., Gandini, A. (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier, pp. 179–199.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajid, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J. Biotechnol.* 5, 1142–1145.
- Ramvalho, P.S., Freitas, V.A.P., Macedo, A., Silva, G., Silva, A.M.S., 1999. Volatile components of *Cistus ladaniferus* leaves. *Flavour Fragr. J.* 14, 300–302.
- Ren, W., Zhenhua, Q., Hongwei, W., Zhu, L., Zhang, L., 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med. Res. Ver.* 23, 519–534.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270–276.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., Larondelle, Y., 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem.* 101, 1012–1018.
- Sosa, T., Chaves, N., Alias, J.C., Escudero, J.C., Henao, F., Gutiérrez-Merino, C., 2004. Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores. *J. Chem. Ecol.* 30, 1087–1101.
- Sosa, T., Alias, J.C., Escudero, J.C., Chaves, N., 2005. Interpopulational variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudates. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 353–364.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 104, 1372–1378.
- Teixeira, S., Mendes, A., Alves, A., Santos, L., 2007. Simultaneous distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladaniferus* L. *Anal. Chim. Acta* 584, 439–446.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Tourino, S., Torres, J.L., Vinardell, M.P., 2007. Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1543–1548.
- Välilmaa, A.-L., Honkalampi-Hämäläinen, U., Pietarinen, S., Willför, S., Holmbom, B., Wright, A., 2007. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 235–243.
- Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 58, 45–54.

## *Anexo II*

---

N. Gil, C. Gil, M.E. Amaral, A.P. Costa, A.P. Duarte (2009). Use of enzymes to improve the refining of a bleached Eucalyptus globulus kraft pulp. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 89-95



## Use of enzymes to improve the refining of a bleached *Eucalyptus globulus* kraft pulp

Nuno Gil<sup>a</sup>, Cristina Gil<sup>a,b</sup>, Maria Emília Amaral<sup>a,b</sup>, Ana Paula Costa<sup>a,b</sup>, Ana Paula Duarte<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal

<sup>b</sup> Department of Paper Science and Technology, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 December 2008

Received in revised form 23 March 2009

Accepted 13 April 2009

#### Keywords:

Pulp refining

Cellulases

Beta-glucanases

*Eucalyptus globulus*

Kraft pulp

Drainage properties

Physical properties

### ABSTRACT

The effect of cellulases and beta-glucanases was evaluated for energy savings in the papermaking refining process. Two commercial enzyme preparations, Celluclast 1.5 L<sup>®</sup> (cellulases mixture) and Viscozyme L<sup>®</sup> (carbohydrases mixture) were used to improve the refining process of a bleached *Eucalyptus globulus* kraft pulp, using different enzyme dosages and different reaction times. This treatment improved pulp drainability (expressed as Schopper–Riegler degree) by up to 80% at the same level of refining energy (1500 PFI revolutions). These results were more significant for cellulases treatment. Pulp degradation was evaluated by the pulp viscosity determination, which was in agreement with the fibre length determination that showed a slight reduction with the enzymatic treatment. The strength properties of the pulp were not affected by enzyme treatment; in fact an increase was observed in paper internal bonding.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The use of enzymes in the pulp and paper industry has suffered a major development in the last two decades. Cellulolytic enzymes have been intensively studied and used in many applications, although in several areas they are still under development. The recycling of paper is an area where the use of enzymes has been implemented, seeing that the recycled fibres' properties can be improved by treatment with cellulases and hemicellulases. In fact, these enzymes modify the interfacial properties of fibres, increasing the affinity for water, which in turn promotes changes in the technical properties of the pulp and paper, such as pulp drainability and paper strength [1–3]. These enzymes are also used for upgrading secondary fibres' deinking [4].

The influence of cellulolytic enzymes in the fibres of Portuguese wood species has been studied by our working group [5–7] and the obtained results showed that commercial cellulases and hemicellulases influenced the properties of unbleached kraft pulps from *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster*. They also showed that treating the fibres of unbleached kraft pulps from *P. pinaster* with commercial xylanases, gave rise to an increase in their flexibility with the consequent improvement in the inter-fibre bonding capac-

ity [8]. The use of xylanases as bleaching boosters has also been a biotechnological application in the pulp and paper industry. The use of these enzymes increases significantly the bleaching aptitude of pulps, since it increases the accessibility of the bleaching chemical agents to the fibres [9–11].

Refining is a papermaking process where the cellulosic fibres are mechanically treated in water, resulting in morphological and structural changes. The main effects of refining in fibres are internal and external fibrillation, fines formation, fibre shortening or cutting and fibre curling or straightening. It is described elsewhere that the treatment of fibres from different sources (e.g. softwood unbleached kraft pulps and recycled pulp from corrugated board) with different commercial cellulases and hemicellulases, results in the reduction of energy consumption during refining [12]. Energy savings are accomplished by the reduction of refining time to achieve the same levels of refining, without affecting the pulp strength properties [12]. Similar results were found for a purified xylanase obtained from the fungus *Trichoderma reesei* [13]. These results are more evident when the treatments are performed in dried pulps instead of non-dried pulps [14] and the best results were found with purified cellulases instead of mixtures [15,16].

The use of a mixture of cellulases and hemicellulases was also tested in an industrial scale, showing a reduction in the energy requirement of 25 kWh/ton of pulp [17]. Energy consumption in the pulp and paper industry is high, contributing to about 18–25% of the production cost. For the development of desired properties of paper, the pulp must be subjected to the refining

\* Corresponding author at: University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal. Tel.: +351 275 319 792; fax: +351 275 319 740.

E-mail address: [apcd@ubi.pt](mailto:apcd@ubi.pt) (A.P. Duarte).

process, which represents 15–18% of the total electrical energy required to produce paper [12,17]. Due to the depletion in available energy and the high energetic cost, energy conservation has become a necessity for the paper industry. Consequently, any pulp treatment that promotes a decreasing in energy consumption, particularly with regard to the refining process, will have a beneficial effect on the global consumption of energy in the paper industry.

The present study evaluated the effect of a treatment with two commercial enzyme mixtures, one composed by cellulases and other mainly composed by beta-glucanases, on a bleached *E. globulus* kraft pulp. The effect of these enzymes in refining was evaluated for different dosages and reaction times in terms of hydrolysed sugars, pulp properties (fibre length and swelling, pulp drainability) and physical properties of the produced paper handsheets.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Pulp

An industrial, dried, elemental chlorine free (ECF) bleached *E. globulus* kraft pulp obtained from a Portuguese mill was used. The viscosity of the pulp was  $853 \text{ mL g}^{-1}$ .

### 2.2. Enzymes

In this study, two commercial enzyme mixtures were used. A mixture of cellulases produced by a selected strain of the fungus *T. reesei* and named Celluclast 1.5 L<sup>®</sup>. The other enzymatic extract, Viscozyme L<sup>®</sup>, is a mixture of carbohydrases degrading enzymes (arabinase, cellulases, beta-glucanases, hemicellulases and xylanase), with higher enzymatic activity for beta-glucanases. This mixture was produced from a selected strain of the fungus *Aspergillus aculeatus*. The enzymatic extracts were kindly supplied by Novo Nordisk.

### 2.3. Enzymatic treatments

The pulp was treated with 1, 2 and 4 IU of cellulases (Cel) and beta-glucanases (bgluc) per gram of oven-dry (o.d.) pulp. This treatment was carried out with a pulp suspension having a consistency of 5% at 50 °C, in beakers, with continuous mechanical agitation. The following reaction times were tested: 1 h for both enzymes and two more times (2 and 4 h) for beta-glucanases. The pH was adjusted to 5 for cellulases treatment and 4.3 for beta-glucanases, using a diluted  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution. After the enzyme treatment, the pulp was filtered in a Buchner funnel using a vacuum pump. The filtrate was recovered and the pulps were washed with deionised water to neutral pH in order to prevent further enzyme reaction. This prevention was confirmed by determining the total reducing sugars (without secondary hydrolysis) in the filtrates immediately after treatment and after 1 and 2 h (at neutral pH and room temperature). The hydrolysis of polysaccharides in percentage of reducing sugars/pulp mass was 0.54, 0.032 and 0.026, respectively.

Control pulps were treated in a similar mode except for the addition of the enzyme.

### 2.4. Characterization of carbohydrates in filtrates

The carbohydrates hydrolysed in the enzymatic treatments and after refining were analysed from the dry residue of the filtrates as total reducing sugars, by the colorimetric method using dinitrosalicylic (DNS) acid [18]. This quantification was performed after a secondary acid hydrolysis (1.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 100 °C, 20 min) of the oligomeric carbohydrates present in the residue.

### 2.5. Pulp characterization

The morphological and biometric properties of fibres were determined by image analysis of a dilute pulp suspension that passes in a flow chamber, using the MORFI<sup>®</sup> equipment. Pulp viscosity was determined before and after enzymatic treatment, according to international standard method ISO 5351/1, which determines the limiting viscosity number of cellulose in a dilute cupri-ethylene-diamine (CED) solution.

All pulp samples were refined in a PFI mill (ISO 5264/2) for 500, 1500 and 3000 revolutions with a pulp consistency of 10% and a refining intensity of 3.33 N/mm. The Schopper–Riegler degree (°SR) method was used to measure pulp drainability and it was determined according to ISO 5267/1 standard method. The laboratory handsheets were prepared in agreement with the ISO 5269-1 standard method and tested regarding physical properties according to ISO 5270. Subsequently, the fibre hydration was determined using the water retention value (WRV), according to the method described by Silvy et al. [19]. This method consists of the soaking of the pulp samples in water with further centrifugation, and the WRV was calculated from the following equation:  $\text{WRV} [\%] = [(W_w - W_d)/W_d] \times 100$ , where  $W_w$  is the mass of the wet sample after centrifugation, and the  $W_d$  is that after wet sample drying at 105 °C to constant weight.

Scanning electron microscopic (SEM) images were obtained in a Hitachi S-2700 after a dehydration treatment of the fibres with ethanol with increasing concentrations and  $\text{CO}_2$ , instead of drying, in order to reveal the external fibrillation.

### 2.6. Statistical methodology

The procedures and statistical methodology for the different tests have been performed following the corresponding standard methods. The mean and standard deviation of the data sets were calculated using the Average and Stdev functions of Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003. The standard error bars were calculated with a confidence interval of 95%. For the mean comparison the Student's *t*-test was applied, and all tests were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Treatment with cellulases mixture

#### 3.1.1. Enzyme action

The hydrolytic action of enzymes on fibres was verified by quantifying the sugars released into the filtrate of enzymatic treatments and also by estimation of the polymerization degree of cellulose, here measured as pulp viscosity (Fig. 1).

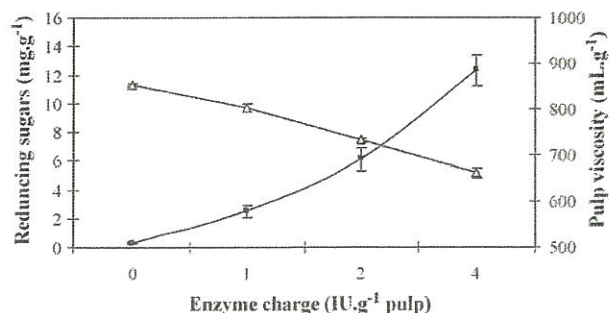


Fig. 1. Effect of cellulases charge on reducing sugars released per gram of pulp (■) and on pulp viscosity (△) (without refining and 1 h of treatment).

**Table 1**  
Effect of cellulases treatment and refining on the length-weighted average fibres' length.

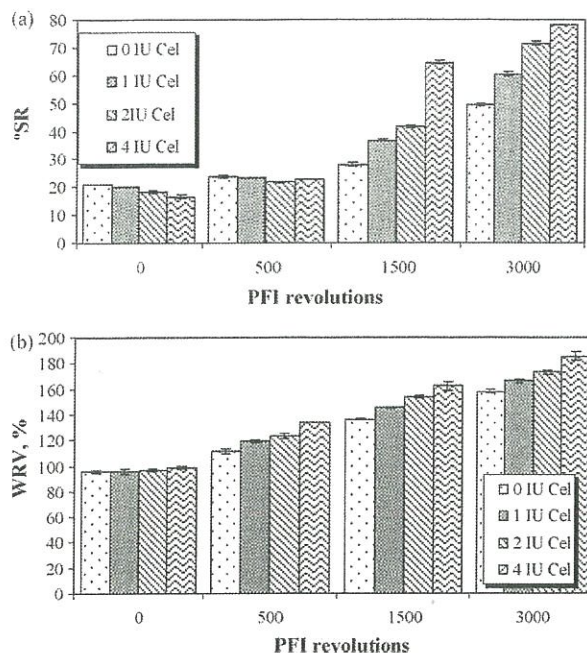
		Enzyme charge (IU · g <sup>-1</sup> pulp)			
		0IU	1IU	2IU	4IU
Length-weighted average fibres length (mm)	0 PFI rev.	0.811	0.809	0.806	0.804
	1500 PFI rev.	0.796	0.773	0.730	0.667

Some authors consider pulp hydrolysis within acceptable values, when it is lesser than 3% [16]. The results obtained in this work showed that pulp hydrolysis did not exceed 1.1%, indicating that the pulp is not substantially degraded by this treatment. The pulp viscosity displayed a decrease of 22.5% showing the hydrolytic action of cellulases, but this decrease does not affect significantly the fibre length (data showed  $p > 0.05$ ), an important fibre property (Table 1). This decrease in pulp viscosity is probably related with the mode of action of cellulases. This enzyme mixture comprises endoglucanases and exoglucanases, and the former are referred as being able to hydrolyse random bonds within the chains of amorphous cellulose [20], thereby producing more ends which give rise to a rapid decrease in cellulose chain length.

The action of these enzymes on the fibres will be preponderant in the effects observed on pulp properties, as it will be seen further on.

### 3.1.2. Effect of enzymatic treatment on refining

The treatment with cellulases gave rise to an improvement in pulp behaviour concerning the refining process, in terms of pulp drainability ( $^{\circ}$ SR) and of fibre hydration (WRV). The graphic in Fig. 2a shows an increase of the  $^{\circ}$ SR for the pulps submitted to the cellulases treatment relatively to the untreated ones. This effect is especially noticeable for 1500 PFI revolutions, where a maximum increase of 80% can be observed. This index is mainly influenced by fibre external fibrillation and by the amount of fine elements [21]. In the case of WRV (Fig. 2b), for the same level of refining (same energy input), a similar trend can be observed, but with a smaller increase in the property (17.5%). The smaller increase of this index, when compared with  $^{\circ}$ SR, is probably related with the fact that it is associated with internal fibrillation [21] and the penetration of the enzymes into the fibre wall is reported as being limited [22]. On the other hand, the higher increase of  $^{\circ}$ SR, which is related with external fibrillation, supports the hypothesis that the enzymes modify the fibres on the surface structure. This increase in external fibrillation is probably related with the action of endoglucanases existing in the cellulases mixture, which apparently cut the cellulose chains on the fibre surface without liberating them from the surface, at low dosage levels [22]. As  $^{\circ}$ SR measurement is related with the fibres' flexibility and the improvement of their bonding capacity,



**Fig. 2.** Evolution of refining process measured by  $^{\circ}$ SR (a) and WRV (b) for the pulp treated with cellulases.

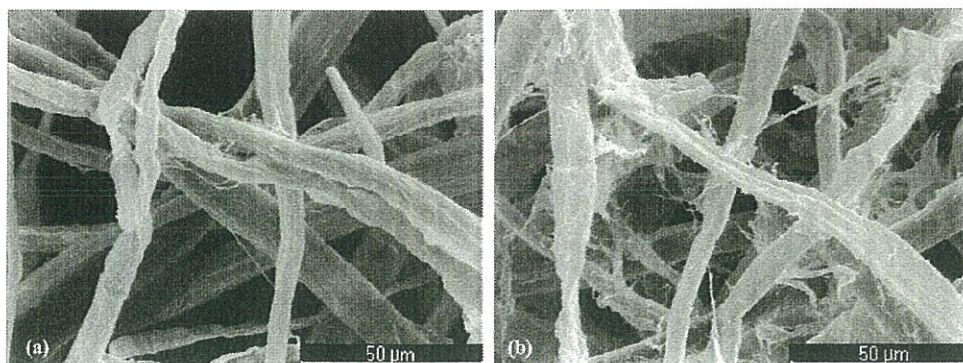
these results are related with the maintenance of the pulp strength properties.

Scanning electron microscopic (SEM) micrographs (Fig. 3) of untreated pulp and a pulp treated with cellulases, refined for 1500 PFI revolutions, were also made to reveal any morphological change in the fibres upon enzymatic hydrolysis. These observations suggest that the action of 4 IU of cellulases takes place mainly at the outer fibre surface, showing the increment in external fibrillation (Fig. 3b). However, the interior surface of the fibres is most likely also accessible to the enzymes.

The significant change in pulp behaviour at 1500 PFI revolutions can also be observed by the reducing sugars released during the refining process and determined in the filtrate collected after refining, as it can be seen in Fig. 4. It is noteworthy that the mechanical treatment carried out in the refining process also gives rise to the release of sugars, by physical degradation of polysaccharides.

### 3.1.3. Effect of enzymatic treatment on the pulp properties

As previously mentioned, the action of enzymes in the degradation of hemicelluloses and cellulose can explain the fibre degradation, which can correspond to a deterioration of the



**Fig. 3.** SEM micrographs of eucalypt kraft pulp refined for 1500 PFI revolutions without enzyme treatment (a), and treated with 4 IU of cellulases (b).

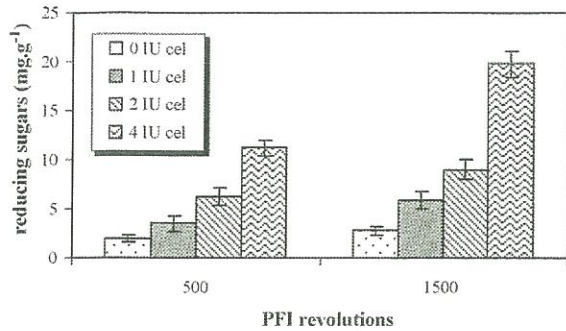


Fig. 4. Evolution of total reducing sugars released per gram of pulp during refining for the pulp treated with cellulases.

physico-mechanical properties of the pulp. This deterioration of pulp properties was not observed in the present work for cellulases concentrations until 2 IU, where tensile strength was improved by up to 34.4% for 1500 PFI revolutions (Fig. 5a). Higher enzyme concentrations and refining levels gave rise to a decrease of this property. This increment in pulp tensile strength with the cellulases treatment is in agreement with results obtained by other authors for other type of pulps [23] and with the results of drainage properties.

It appears that enzymes are responsible for a biorefining effect, which means that they are able to produce external fibrillation on fibres without mechanical refining, improve paper properties that depend on fibril content. This fact is displayed in Fig. 5b, where an increase of 15% in tensile index with increasing enzyme concentration for unrefined pulp. Paper internal bond strength is also improved by enzymatic treatment more markedly (Fig. 6a). This property was increased by up to 91% for the pulp treated with an enzyme charge of 4 IU and 1500 PFI revolutions. The biorefining effect can also be observed with this property (Fig. 6b), since an

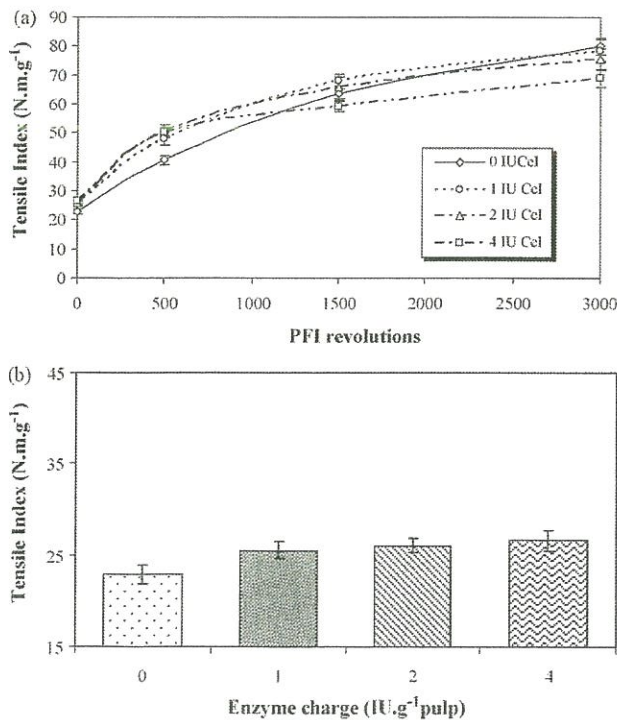


Fig. 5. Evolution of tensile index during refining for the pulps with different treatments (a) and for unrefined pulp treated with enzyme (b).

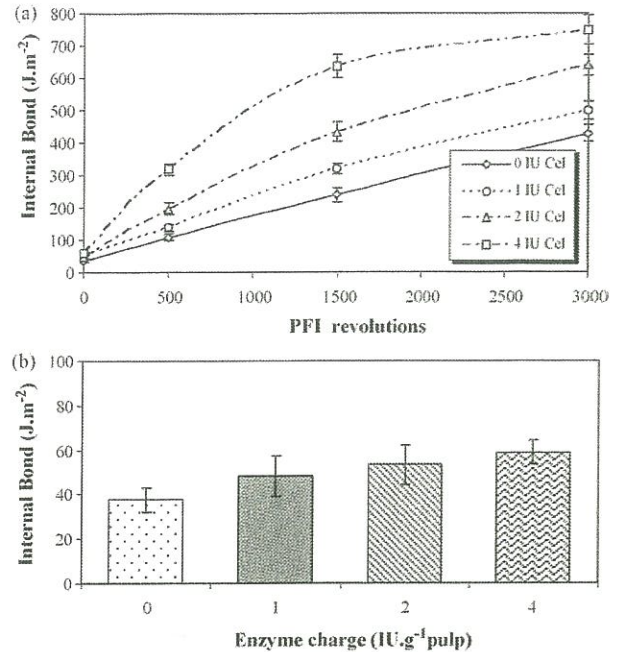


Fig. 6. Evolution of internal bond strength during refining for the pulps with different treatments (a) and for unrefined pulp treated with enzyme (b).

increment of 43.5% was achieved for higher enzyme dosage in the case of unrefined pulp. Once again, this behaviour can be explained by the increased fibre external fibrillation. These results are in agreement with results presented by other authors [24], which found that an increase in external fibrillation by 0.3–0.7%, increased the tensile strength by about 20% and internal bond strength by 46%.

### 3.2. Treatment with beta-glucanases

The essays with beta-glucanases were performed with the same conditions that were used for cellulases treatment. However, this treatment did not show significant influence on pulp properties. Thus, the next step was to study the influence of reaction time on the enzymatic treatment for an enzyme concentration of 4 IU. Fig. 7 shows that for increasing reaction times the effect of beta-glucanases is more noticeable.

Nevertheless, despite the beneficial effect of the treatment time on °SR, with an increase of 57% (Fig. 7a), a decrease of 34% in the intrinsic strength of the fibre was observed, given by the wet zero-span tensile strength, as shown in Fig. 7b.

#### 3.2.1. Enzyme action

As was already exhibited for cellulases treatment, the beta-glucanases treatment does not degrade the pulp significantly, since the pulp hydrolysis in terms of total reducing sugars released, was about 1–1.2%, as can be observed in Fig. 8 ( $p > 0.05$ ).

Regarding the effect of this enzymes mixture on pulp viscosity, this property displayed a slightly decrease (2.7%) for 1 h of treatment, indicating low degradation of fibres, which is consistent with a slight fibre length variation (Table 2). For 2 h of treatment, the pulp viscosity decreased by up to 6.5%, symptomatic of the reduced hydrolytic action of these enzymes when compared with cellulases treatment (Fig. 1). This behaviour is in agreement with the enzymes action, since the decrease in viscosity is mainly related with the endoglucanases as was previously described in this study.

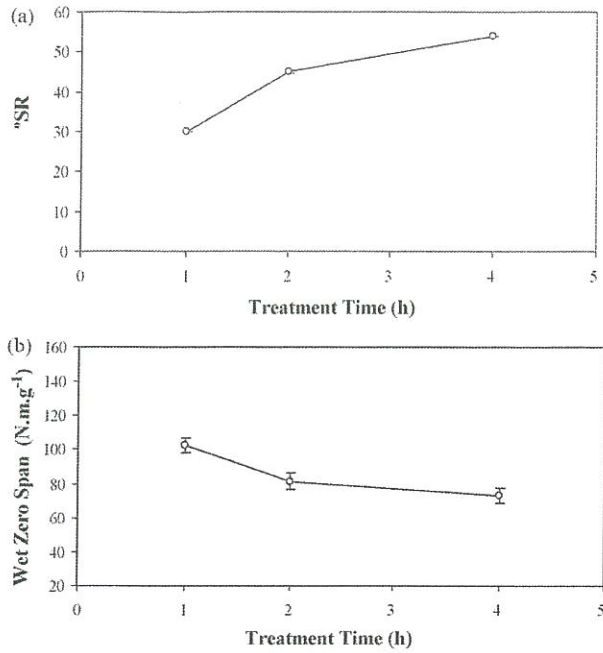


Fig. 7. Evolution of Schopper–Riegler degree (a) and wet zero-span tensile strength (b) for different reaction times using pulps treated with 4 IU beta-gluconases.

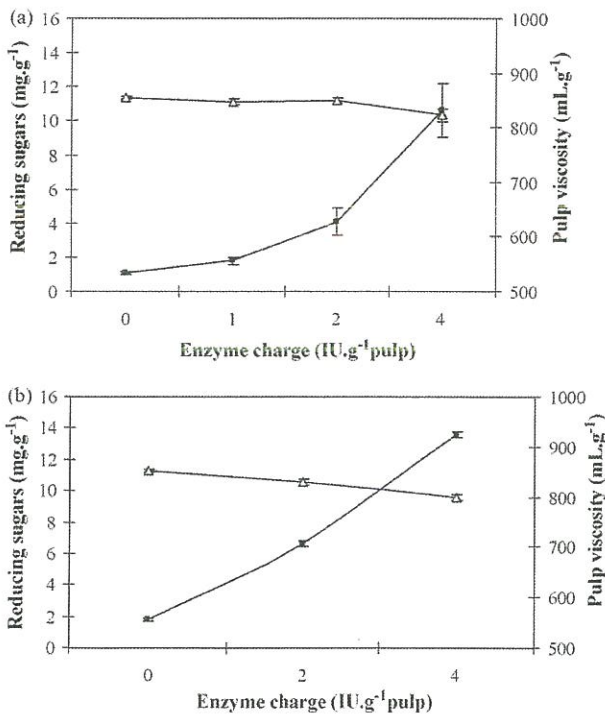


Fig. 8. Effect of beta-gluconases charge on reducing sugars released per gram of pulp (■) and on pulp viscosity (Δ), without refining for 1 h (a) and for 2 h (b) of treatment.

Table 2  
Effect of beta-gluconases treatment (1 h) and refining on the length-weighted average fibres' length.

	Enzyme charge, (IU · g <sup>-1</sup> pulp)				
		0IU	1IU	2IU	4IU
Length-weighted average	0 PFI rev.	0.803	0.803	0.803	0.803
fibers length (mm)	1500 PFI rev.	0.796	0.794	0.794	0.787

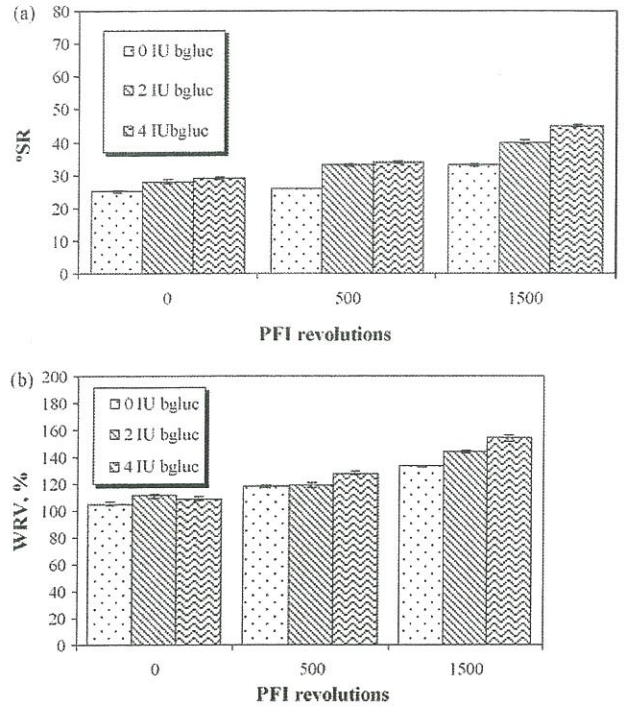


Fig. 9. Evolution of refining process measured by SR (a) and WRV (b) for the pulps treated with beta-gluconases and a reaction time of 2 h.

3.2.2. Effect of enzymatic treatment on refining

The treatment with beta-gluconases, as was observed for cellulases treatment, also gave rise to an increase of °SR and fibre hydration (Fig. 9), but less evident. This effect became also more obvious after 1500 PFI revolutions, where increments of 36% and 7.9% were reached for °SR and WRV, respectively.

The effect of this enzymatic treatment on pulp behaviour, after refining for 1500 PFI revolutions, can also be observed by the reducing sugars released during this process (Fig. 10). These carbohydrates were released in lesser amounts than in the case of cellulases treatment, which is in agreement with the lower enzymatic action of beta-gluconases treatment described above. Apparently, the enzymes of this mixture cut the polysaccharide chains on the fibre surface without liberating them from the surface. On the other hand, considering the main composition of this enzyme mixture (hemicellulases), it appears that small changes in the hemicelluloses content do not significantly affect pulp properties during refining.

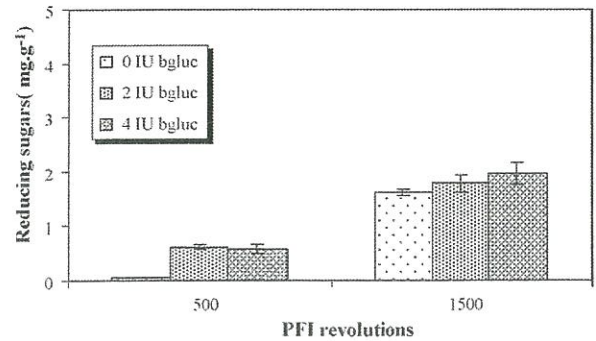


Fig. 10. Evolution of total reducing sugars released per gram of pulp with refining for the pulp treated with beta-gluconases.

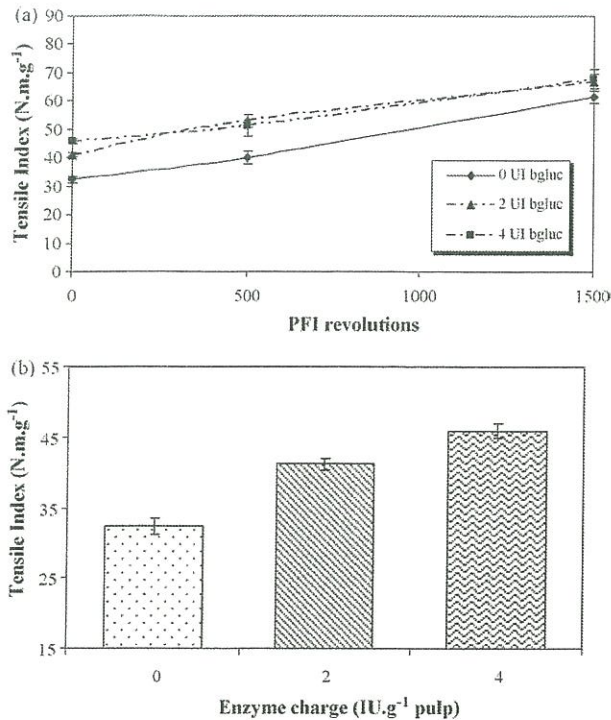


Fig. 11. Evolution of tensile index with refining for the pulps with different treatments (a) and for unrefined pulp treated with enzyme (b).

### 3.2.3. Effect of enzymatic treatment on the pulp properties

The pulp treatment with beta-glucanases also gave rise to increased strength properties, but to a lesser extent than the cellulases treatment (Figs. 11a and 12a). Tensile index exhibited an

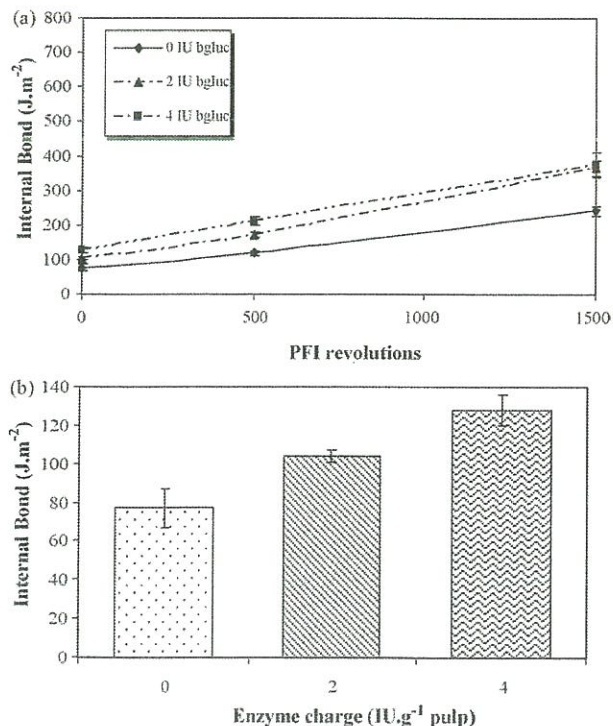


Fig. 12. Evolution of internal bond during refining for the pulps with different treatments (a) and for unrefined pulp treated with enzyme (b).

improvement of 9.7% for 1500 PFI revolutions and in the case of internal bond this improvement was 43.4%.

Surprisingly, the biorefining effect referred for cellulases treatment is more marked for these enzymes, even if they did not show significant effect in drainage properties. Tensile strength of pulp without refining was improved by up to 34.7% when enzyme charge rose from 0 to 4 IU/g of pulp (Fig. 11b). The corresponding increase in internal bond strength was 49.8% (Fig. 12b). The disrupted structure of polysaccharides left in fibre surface is more accessible and probably gave rise to the increased fibre-to-fibre bonding responsible for the improved strength properties.

## 4. Conclusions

The results achieved in this work showed that biotechnology can positively contribute to the pulp and paper industry. This work showed that the action of an enzymatic treatment before refining increases the rate of drainage of the pulp and the degree of hydration of the fibres. This effect, more evident in the case of the addition of cellulases, probably results from the fact that most of these enzymes degrade the cell wall at the surface. This degradation apparently leads to a greater exposed surface apt to establish bonds with the water molecules and thus to contribute to greater hydration. The behaviour exhibited by the studied pulps suggests that for achieving a certain refining degree, lower amounts of energy supply are necessary when the pulp is pre-treated with carbohydrases.

The strength properties of the pulp were not harmfully influenced by the studied enzymes; they were even increased, although some degradation of the fibres has been seen in the case of cellulases. For beta-glucanases the best performance in the refining process was obtained with higher reaction times and concentrations, but the intrinsic strength of the fibre was slightly degraded.

Enzymatic treatment with both enzyme mixtures gave rise to better pulp properties, even without mechanical refining, which is in agreement with the biorefining concept, i.e. the refining of the pulp fibres by enzymes.

## References

- [1] D. Dienes, A. Egyházi, K. Réczey, Treatment of recycled fibre with *Trichoderma* cellulases, *Ind. Crops Prod.* 20 (2004) 11–21.
- [2] T. Oksanen, J. Pere, L. Paavilainen, J. Buchert, L. Viikari, Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases, *J. Biotechnol.* 78 (2000) 39–48.
- [3] H. Pala, M. Mota, F.M. Gama, Enzymatic modification of paper fibres, *Biocat. Biotransf.* 20 (5) (2002) 353–361.
- [4] M.A. Pèlach, F.J. Pastor, J. Puig, F. Vilseca, P. Mutjé, Enzymic deinking of old newspapers with cellulase, *Process Biochem.* 38 (7) (2003) 1063–1067.
- [5] I. Spiridon, A.P. Duarte, Some preliminary data on the enzymatic hydrolysis of *Pinus pinaster* kraft pulp, *Cell. Chem. Technol.* 38 (1–2) (2004) 59–65.
- [6] I. Spiridon, M.N. Belgacem, A.P. Duarte, The behaviour of two main Portuguese wood species towards enzymatic hydrolysis, *Cell. Chem. Technol.* 35 (3–4) (2001) 243–251.
- [7] I. Spiridon, A.P. Duarte, M.N. Belgacem, Enzymatic hydrolysis of *Pinus pinaster* kraft pulp, *Appita J.* 54 (5) (2001) 457–459.
- [8] I. Spiridon, A.P. Duarte, J. Curto, Influence of xylanase treatment on *Pinus pinaster* pulp, *Cell. Chem. Technol.* 37 (5–6) (2003) 497–504.
- [9] M.B. Roncero, A.L. Torres, J.F. Colom, T. Vidal, Using xylanase before oxygen delignification on TCF bleaching: influence on fibre surfaces by SEM, *Process Biochem.* 36 (2000) 45–50.
- [10] M.B. Roncero, A.L. Torres, J.F. Colom, T. Vidal, The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 21–30.
- [11] A.K. Shah, D. Cooper, R. Adolphson, K.-E.L. Eriksson, Xylanase treatment of oxygen-bleached hardwood kraft pulp at high temperature and alkaline pH levels gives substantial savings in bleaching chemicals, *J. Pulp Pap. Sci.* 26 (1) (2000) 8–11.
- [12] N.K. Bhardwaj, P. Bajpai, P.K. Bajpai, Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability, *J. Biotechnol.* 51 (1996) 21–26.
- [13] K.K.Y. Wong, R.P. Kibblewhite, F.A.J. Signal, Effect of xylanase and dosage on the refining properties of unbleached softwood kraft pulp, *J. Wood Chem. Technol.* 19 (3) (1999) 205–212.

- [14] O. García, A.L. Torres, J.F. Colom, F.I.J. Pastor, P. Díaz, T. Vidal, Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dries eucalyptus pulp, *Cellulose* 9 (2002) 115–125.
- [15] J. Pere, M. Siika-aho, J. Buchert, L. Viikari, Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fibre properties of kraft pulp, *Tappi J.* 78 (6) (1995) 71–78.
- [16] J. Pere, M. Siika-aho, L. Viikari, Biomechanical pulping with enzymes: response of coarse mechanical pulp to enzymatic modification and secondary refining, *Tappi J.* 83 (5) (2000) 1–8.
- [17] P. Bajpai, S.P. Mishra, O.P. Mishra, S. Kumar, P.K. Bajpai, Use of enzymes for reduction in refining energy—laboratory studies, *Tappi J.* 5 (11) (2006) 25–32.
- [18] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–431.
- [19] J. Silvy, G. Romatier, R. Chiodi, Méthodes pratiques de contrôle du raffinage, *Revue A.T.I.P.* 22 (1968) 31–53.
- [20] R.A.J. Warren, Microbial hydrolysis of polysaccharides, *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 183–212.
- [21] E. Retulainen, K. Niskanen, N. Nilsen, Fibres and bonds, papers physics, *Papermaking Sci. Technol.* 16 (1998) 55–87.
- [22] T. Oksanen, J. Pere, J. Buchert, L. Viikari, The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pulp, *Cellulose* 4 (1997) 329–339.
- [23] K.K.Y. Wong, J.D. Richardson, S.D. Mansfield, Enzymatic treatment of mechanical pulp fibres for improving papermaking properties, *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 1025–1029.
- [24] T. Kang, H. Paulapuro, Effect of external fibrillation on paper strength, *Pulp Paper Can.* 107 (7/8) (2006) 51–54.

## ***Anexo III***

---

A Luís, F. Domingues, C. Gil, A.P. Duarte (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp., *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 886-893.

Full Length Research Paper

# Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp.

Ângelo Luís<sup>1</sup>, Fernanda Domingues<sup>2</sup>, Cristina Gil<sup>1</sup>, and Ana Paula Duarte<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal.

<sup>2</sup>Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal.

Accepted 16 September 2009

Polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant or anticarcinogenic activities. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of extracts of some shrubs that grow spontaneously in Portugal (*Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp.) and then to correlate it with total phenolic and flavonoid compounds. The Folin-C method was used to determine total phenols while a colorimetric method with aluminum chloride was used for the determination of total flavonoids. Regarding the determination of antioxidant activity, two distinct methods (DPPH assay and beta-carotene bleaching test) were used. It was concluded that all the extracts presented relevant antioxidant activity and there was a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content.

**Key words:** Vegetal extracts, phenolics, flavonoids, antioxidant activity.

## INTRODUCTION

The Portuguese forest area is around 3.3 million hectares which represents about 38% of the territory. This leads to the production of large quantities of forest residues composed by several different shrubs species and tree branches. Examples of shrubs that grow spontaneously in Portuguese forests are *Pterospartum tridentatum* (known as *carqueija* or *carqueja* in Portugal), *Cytisus scoparius* (broom), and *Erica* spp. (heather) (Andrade et al., 2009). Those plants can be used as raw material for achieving high value chemicals, like bioactive compounds. Among these bioactive compounds, polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant and anticarcinogenic activities (Andrade et al., 2009; Alim et al., 2009).

The flowers of *P. tridentatum* are traditionally harvested

in spring and used either in popular medicine for the treatment of throat irritation conditions and in herbal mixtures for diabetes or to flavour rice and roast meat (Grosso et al., 2007).

*C. scoparius* is used in folk medicine as diuretic, hypnotic and sedative, anti-diabetic and also as hepatoprotective (Raja et al., 2007; Sundararajan et al., 2006). *C. scoparius* contains flavones like 6''-O acetylscoparin (Raja et al., 2007; Sundararajan et al., 2006; Nirmal et al., 2008), flavonals, namely rutin, quercetin, isorhamnetin and kaempferol (Raja et al., 2007; Sundararajan et al., 2006; Nirmal et al., 2008) and some isoflavones like genistein and sarothamnoside (Raja et al., 2007; Sundararajan et al., 2006; Nirmal et al., 2008). Three carotenoids of chrysanthemaxanthin, xanthophylls and xanthophillepoxide are also reported (Raja et al., 2007; Sundararajan et al., 2006; Nirmal et al., 2008) to be present in the plant.

*Erica* spp. is often used in east of Morocco by hyperlipidaemic subjects as an alternative therapeutical tool to treat hyperlipidaemia (Harfani et al., 2007), and has also been used in folk medicine as a diuretic and antiseptic agent (Harfani et al., 2007; Akkol et al., 2007). The phytochemical study of this plant showed that tannins, proan-

\*Corresponding author. Email: [apcd@ubi.pt](mailto:apcd@ubi.pt). Tel: +351 275319792.

**Abbreviations:** DPPH; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, Folin-C; folin-ciocalteu, BHT; butylated hydroxytoluene.

thocyanidols and flavonoids represent major compounds of its flowers (Harfani et al., 2007; Akkol et al., 2007; Ay et al., 2007).

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of various diseases such as atherosclerosis, alcoholic liver cirrhosis and cancer (Sundararajan et al., 2006; Tawaha et al., 2007; Nanasombat and Teckchuen, 2009). External antioxidants, like antioxidants extracted from plants, can be administrated in order to combat those radicals (Tawaha et al., 2007; Miliuskas et al., 2004; Silva et al., 2007; Pourmorad et al., 2006; Nanasombat and Teckchuen, 2009). In food industries, lipid oxidation in foods is also inhibited by free radicals scavengers.

Studies have demonstrated that synthetic antioxidants, like BHT (butylated hydroxytoluene), commonly used in this industry, have some toxic effects. So, due to the possible problems caused by the consumption of synthetic antioxidants, research has focused on finding natural products with antioxidant activity that could replace synthetic antioxidants or make associations between them (Tawaha et al., 2007; Miliuskas et al., 2004; Silva et al., 2007; Pourmorad et al., 2006; Aiyegoro et al., 2009).

The purpose of this work was to determine the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of some shrubs (*P. tridentatum*, *C. scoparius* and *Erica* spp.) and then try to correlate it with total phenolic compounds and total flavonoids. The Folin-Ciocalteu's method was used for the determination of total phenols; a colorimetric method with aluminum chloride was used in the determination of total flavonoids and each extract's antioxidant activity was assessed by determining its ability to scavenge DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical. The beta-carotene bleaching test was optimized and also used to determine the antioxidant activity of extracts.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Aerial parts of the shrubs (*P. tridentatum*, *C. scoparius* and *Erica* spp.) were collected in Serra da Estrela. Plant materials were dried at room temperature during 3 months and reduced to coarse powder (< 2 mm) using a laboratory cutting mill. A voucher specimen of all species of shrubs has been deposited in the Biology Laboratory of Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Portugal.

### Extraction process

Ethanolic extracts were carried out with shoxlet apparatus until the solvent became colorless, using 100 g of plant and 1000 ml of solvent. Aqueous extractions were performed by refluxing, using 100 g of plant samples during 30 min and with 1000 ml of water. The extract solutions were filtered under vacuum using a crucible of porosity 2 and then were distilled under vacuum to remove the solvents to a final volume of 150 ml. Then, 5 ml of each extract was diluted in 45 ml of methanol. Aliquots (50 ml) of the extracts were removed for subsequent evaporation to dryness for the calculation of extraction yield.

### Total phenolic compounds determination

The phenols were determined by Folin-Ciocalteu's colorimetric method. The methanol solutions of each shrub extract (50 µl) or gallic acid (standard phenolic compound) were mixed with 450 µl of distilled water and then 2.5 ml of Folin-Ciocalteu's reagent 0.2 N (diluted with distilled water) was added. The mixtures were allowed to stand for 5 min, and then 2 ml of aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/L) was added. After incubation of the resulting reaction mixtures (90 min / 30 °C) the total phenols were determined by colorimetry at 765 nm. The standard curve was prepared using 500, 400, 350, 325, 300, 250, 225, 200, 150, 125, 100 and 50 mg/L solutions of gallic acid in methanol ( $y=0.0008x$ ;  $R^2=0.9769$ ). Total phenol values were expressed as gallic acid equivalents (mg/g of dry mass), which is a common reference compound for phenolic compounds (Tawaha et al., 2007; Pourmorad et al., 2006; Alim et al., 2009; Nanasombat and Teckchuen, 2009).

### Total flavonoids determination

Aluminum chloride colorimetric method was used for flavonoid determination according to Pourmorad et al. (2006), each shrub extract (500 µl) in methanol was separately mixed with 1.5 ml of methanol, 0.1 ml of 10% aluminum chloride, 0.1 ml of 1 M potassium acetate and 2.8 ml of distilled water. The prepared solution was left to stay for 30 min at room temperature, before being submitted to the absorbance measurements. The absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm using a spectrophotometer. The calibration curve was constructed by preparing eight quercetin solutions at concentrations ranging from 12.5 to 200 µg/ml in methanol ( $y=0.0068x$ ;  $R^2=0.9993$ ). Total flavonoid values were expressed as quercetin equivalents (mg/g of dry mass), which is a common reference compound for flavonoids (Pourmorad et al., 2006; Alim et al., 2009).

### Evaluation of antioxidant activity

#### DPPH scavenging assay

The antioxidant activity of the extracts and standards (gallic acid and trolox) was determined by the radical scavenging activity method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) as, previously described by Scherer and Godoy (2009). Briefly, about 0.1 ml aliquots of methanolic solutions of the extracts or standards at different concentrations were added to 3.9 ml of a DPPH methanolic solution. Three DPPH solutions were tested, 0.2000, 0.1242 and 0.0800 mM, prepared by dissolving 39.4, 24.5 and 15.8 mg in 500 ml of methanol, respectively. These concentrations were selected due to the linearity range of DPPH solutions: above 0.2 mM the concentration is very high, and below 0.5 mM the color is very weak having a limited range of absorbance reading. The blank sample consisted of 0.1 ml of methanol added to 3.9 ml of DPPH. After a 90 min incubation period at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 517 nm. The radical scavenging activity was calculated as follows:  $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$ , where  $Abs_0$  was the absorbance of the blank and  $Abs_1$  was the absorbance in the presence of the test compound at different concentrations. The IC<sub>50</sub> (concentration providing 50% inhibition of DPPH radicals) was calculated graphically using a calibration curve in the linear range by plotting the extract concentration vs the corresponding scavenging effect. The antioxidant activity was expressed as the antioxidant activity index (AAI), calculated as follows as (Scherer and Godoy, 2009):

$$AAI = \frac{\text{final concentration of DPPH } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})} \times 100$$

Thus, the AAI was calculated considering the mass of DPPH and the mass of the tested compound in the reaction, resulting in a constant for each compound, independent of the concentration of DPPH and sample used. In this work, it was considered that shrub extracts showed poor antioxidant activity when AAI < 0.5, moderate antioxidant activity when AAI between 0.5 and 1.0, strong antioxidant activity when AAI between 1.0 and 2.0, and very strong when AAI > 2.0 according to Scherer and Godoy (2009). Assays were carried out in triplicate and all the samples and standard solutions, as well as the DPPH solutions, were prepared daily (Nanasombat and Teckchuen, 2009).

#### Beta-carotene bleaching test

Briefly, 20  $\mu$ l of beta-carotene solution (20 mg/ml in chloroform) was added to 40  $\mu$ l of linoleic acid, 400 mg of Tween 40 and 1 ml of chloroform (Broinzi et al., 2007). This mixture was then evaporated at 45°C for 5 min by using a rotary vacuum evaporator to remove chloroform and immediately diluted with 100 ml of oxygenated distilled water. The water was added slowly to the mixture and vigorously agitated to form an emulsion (Conforti et al., 2009). About 5 ml of the emulsion were transferred into test tubes containing 300  $\mu$ l of extracts in methanol at different concentrations. About 5 ml of the emulsion and 300  $\mu$ l of samples in methanol were used as control. Standard butylated hydroxytoluene (BHT) in methanol, at the same concentration as samples, was used as reference. The tubes were then gently shaken and placed at 50°C in a water bath for 2 h (Broinzi et al., 2007; Conforti et al., 2009; Obied et al., 2007). The absorbances of the extracts, standard and control were measured at 470 nm, using a spectrophotometer against a blank consisting of an emulsion without beta-carotene. The measurements were carried out at initial time (t=0) and at final time (t=2). All samples were assayed in duplicate.

The antioxidant activity was measured in terms of percentage of inhibition of beta-carotene's oxidation by:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{Abs_{sample}^{t=2} - Abs_{control}^{t=2}}{Abs_{control}^{t=0} - Abs_{control}^{t=2}}$$

Where;  $Abs^{t=2}$  was the absorbance of the sample or control at final time of incubation and  $Abs^{t=0}$  was the absorbance in the control at initial time of incubation (Obied et al., 2007).

## RESULTS

In this study the antioxidant activity of some shrubs (*P. tridentatum*, *C. scoparius* and *Erica* spp.) was examined. The total phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu method and total flavonoids were also measured using the aluminum chloride method. The results are reported in Table 1 and Figure 1.

#### Extraction yields

From the results presented in Table 1 we verified that *P. tridentatum* gives rise to higher yields than the other shrubs and the ethanolic extracts present higher contents than the aqueous ones.

#### Total phenolic compounds

The quantitative determination of phenolic compounds using Folin-Ciocalteu method is a widespread assay (Tawaha et al., 2007; Pourmorad et al., 2006; Cicco et al., 2009; Alim et al., 2009; Nanasombat and Teckchuen, 2009). It involves the oxidation of phenols in alkaline solution by the yellow molybdo-tungstophosphoric heteropolyanion reagent and colorimetric measurement of the resultant molybdo-tungstophosphate blue. These blue pigments have a maximum absorption depending on the qualitative and/or quantitative composition of phenolic mixtures besides the pH of solutions, usually obtained by adding sodium carbonate (Cicco et al., 2009).

Table 1 shows total phenolic content in terms of gallic acid equivalents. The extract that displayed the highest concentration of total phenols (Table 1) is the ethanolic extract of *C. scoparius* and the extract that showed the lowest concentration of total phenols (Table 1) is the aqueous extract of *C. scoparius*. Among the ethanolic extracts, the extract which had the highest amount of phenols is the one from *C. scoparius* while *Erica* spp. had the lowest amount of total phenols (Table 1). Regarding aqueous extracts, *P. tridentatum* presented the greatest amount of total phenols (Table 1).

#### Total flavonoids

The process used in quantitative methods for the total flavonoids determination is performed by precipitating with aluminum chloride ( $AlCl_3$ ) in an alkalized medium. This precipitate acquires a color and therefore lends itself to the colorimetric assay. The flavonoids in the presence of aluminum chloride have an intense yellow fluorescence when observed under UV filtered (Alim et al., 2009).

The extract that had the highest concentration in total flavonoids is the ethanolic extract of *C. scoparius*, while the aqueous extract of *Erica* spp. showed the lowest concentration of total flavonoids (Figure 1). Among the ethanolic extracts, the extract which had a higher amount of flavonoids (Figure 1) was the extract of *C. scoparius* and *P. tridentatum* presented the least amount in total flavonoids (Figure 1).

#### Antioxidant activity by DPPH method

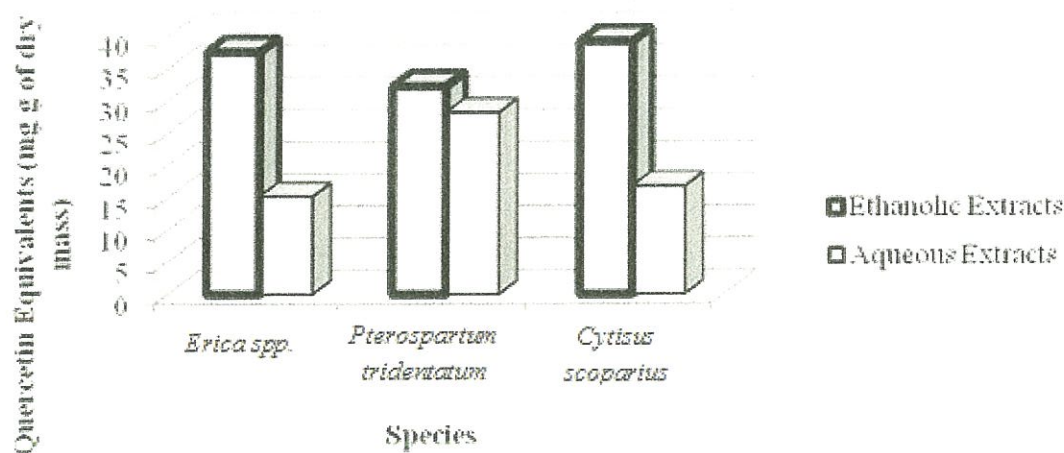
The DPPH radical absorbs at 517 nm and in a second substrate-free system, antioxidant activity can be determined by monitoring the decrease in this absorbance. Results were reported as  $IC_{50}$ , which is defined as the amount of antioxidant required to inhibit 50% of DPPH free radicals under the experimental conditions (Antolovich et al., 2002; Nanasombat and Teckchuen, 2009).

The extract that required the lowest concentration to

**Table 1.** Extraction yield, total phenolic content and antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of some Portuguese shrubs.

Extracts	Shrub	Extraction yield (%)	Total phenolic content (Gallic acid equivalents mg/g of dry mass)*	IC <sub>50</sub> (mg/L) *	AAI *	Antioxidant activity
<b>Ethanolic</b>	<i>Erica spp.</i>	11.64	141.49 ± 1.23	41.28 ± 1.90	1.40 ± 0.07	Strong
	<i>Pterospartum tridentatum</i>	28.61	196.61 ± 3.94	60.39 ± 1.78	0.97 ± 0.03	Moderate
	<i>Cytisus scoparius</i>	11.76	225.32 ± 4.08	65.43 ± 2.47	0.86 ± 0.03	Moderate
<b>Aqueous</b>	<i>Erica spp.</i>	4.64	212.73 ± 1.64	34.53 ± 1.45	1.72 ± 0.08	Strong
	<i>Pterospartum tridentatum</i>	12.01	222.69 ± 5.12	42.97 ± 1.69	1.30 ± 0.05	Strong
	<i>Cytisus scoparius</i>	4.98	134.67 ± 0.14	120.42 ± 5.33	0.45 ± 0.02	Poor
<i>Trolox</i>		---	---	7.10 ± 0.08	7.18 ± 0.08	Very Strong
<i>Gallic Acid</i>		---	---	1.81 ± 0.02	30.72 ± 0.27	Very Strong

\* Results in terms of mean ± standard deviation.

**Figure 1.** Total flavonoids content of aqueous and ethanolic extracts of some Portuguese shrubs.

promote 50% of inhibition (Table 1), was the aqueous extract of *Erica spp.* Thus, the antioxidant activity of this extract is greater than the others; and the value of the AAI is also the largest of all the extracts (Table 1), which classifies the activity of this extract as being a strong antioxidant. Except for *C. scoparius*, the aqueous extracts (Table 1) have a higher AAI than the ethanolic extracts of the same species. Of all studied extracts, *C. scoparius* (Table 1) had the lowest antioxidant properties. The studied extracts presented lower antioxidant activity than the reference compounds, with the lowest antioxidant activity being attributed to *C. scoparius* aqueous extract (Table 1).

#### Antioxidant activity by beta-carotene bleaching test

The mechanism of beta-carotene bleaching is a free

radical-mediated phenomenon resulting from the hydroperoxides formed from linoleic acid by air oxidation. The antioxidant activity of carotenoids is based on the radical adducts of carotenoids with free radicals formed from linoleic acid. The linoleic acid free radical, formed upon the abstraction of a hydrogen atom from one of its diallylic methylene groups, attacks the highly unsaturated beta-carotene molecules. As beta-carotene molecules lose their double bonds by oxidation in this model system, in the absence of an antioxidant, the compound loses its chromophore and characteristic orange colour, which can be spectrophotometrically monitored (Wang et al., 2009).

All the plant extracts presented anti-oxidant properties as measured by this method (Figures 2 and 3). The extract of *P. tridentatum* has the highest percentage of inhibition of oxidation of beta-carotene among the ethanolic extracts (Figure 2). The ethanolic extract of *Erica*

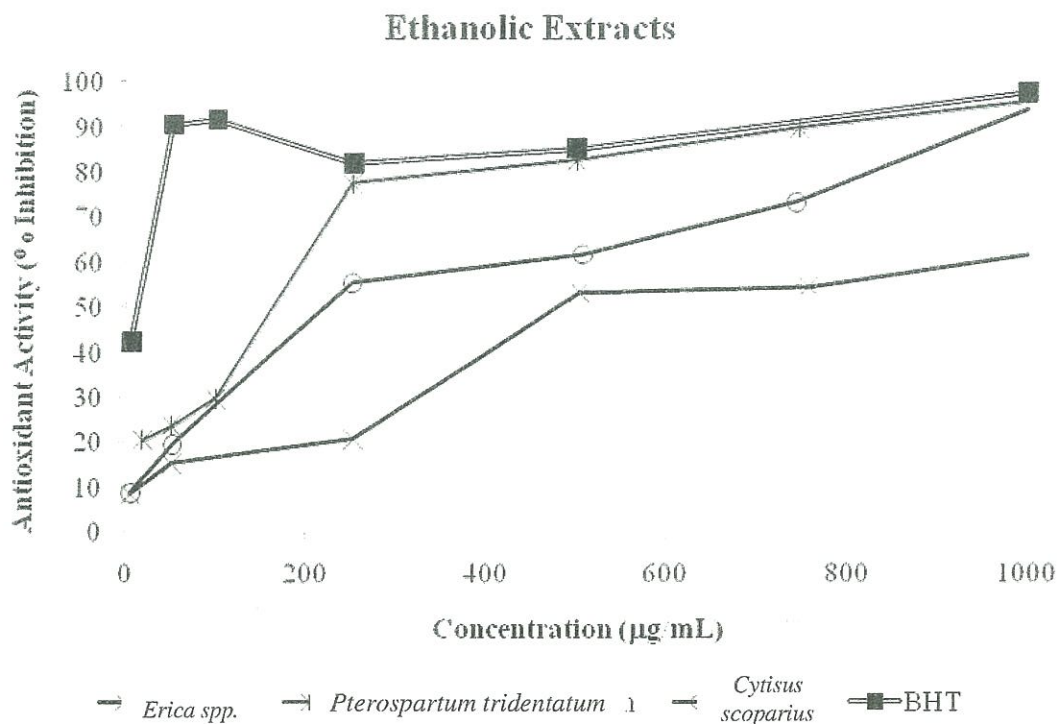


Figure 2. Antioxidant activity of ethanollic extracts.

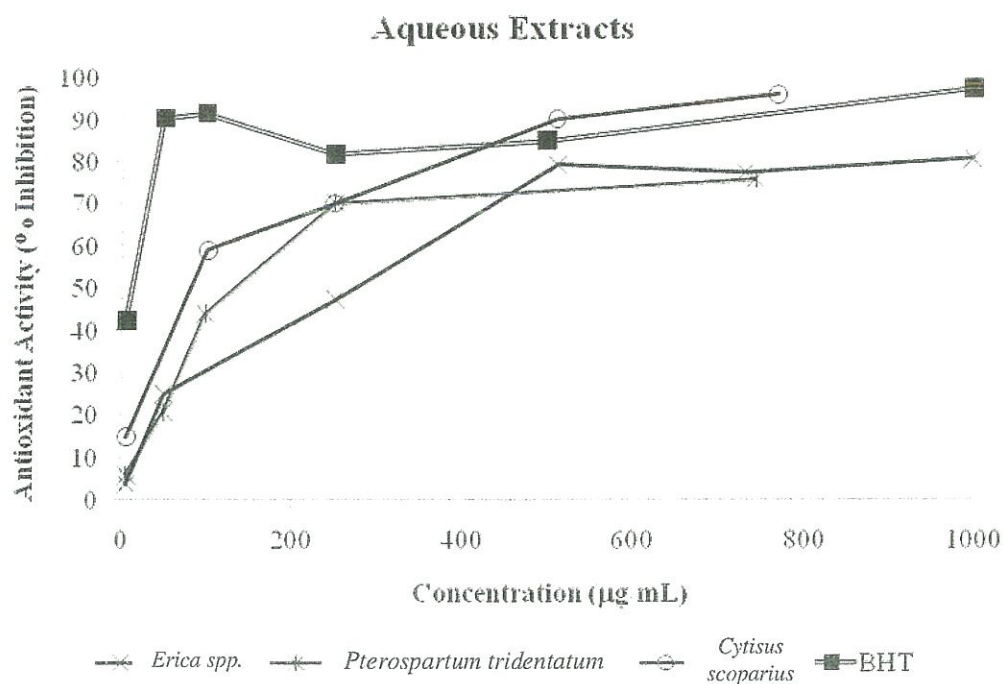


Figure 3. Antioxidant activity of aqueous extracts.

*Erica spp.* has the lowest antioxidant activity according to this method (Figure 3). The aqueous extract of *C. scoparius* presents the highest percentages of inhibition

of oxidation of beta-carotene (Figure 3). Ethanollic extract of *P. tridentatum* displayed anti-oxidant properties similar to those of the anti-oxidant standard BHT, though for

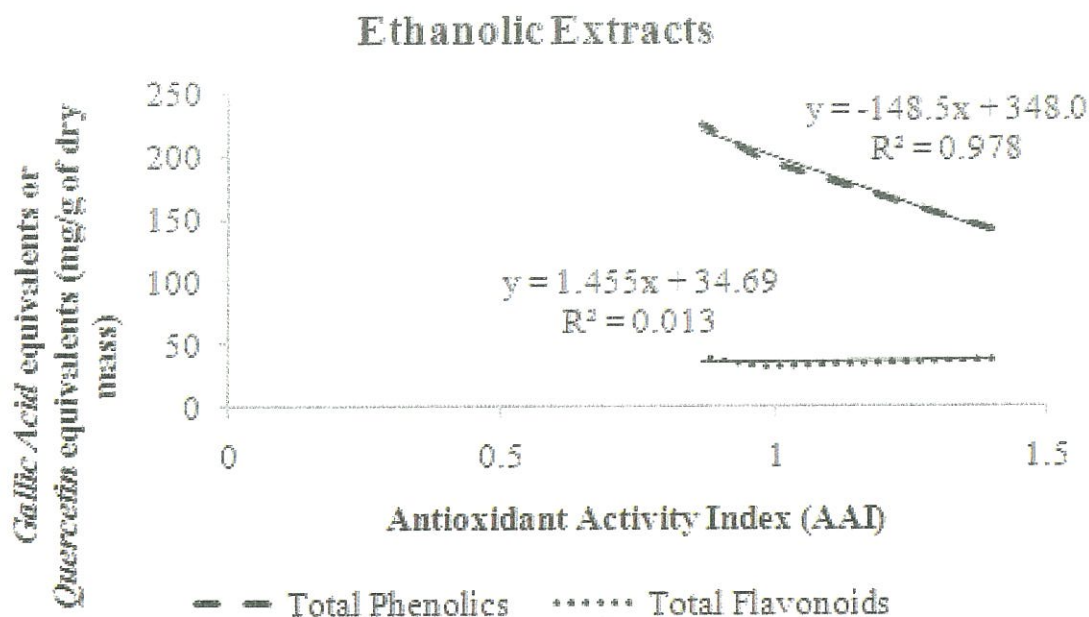


Figure 4. Antioxidant activity, total phenolic compounds and total flavonoids of ethanolic extracts.

higher concentrations.

## DISCUSSION

The extraction yields obtained are very similar to those obtained for some medicinal plants reported in literature (Silva et al., 2007). Furthermore, the extraction process using ethanol as solvent was found to be more efficient than water in extracting the antioxidants present in vegetables, especially the carotenoids (Kaur et al., 2002).

So far as plant phenolics represent one of the major groups of compounds acting as primary antioxidants or free radical terminators, it was reasonable to determine their total amount in the selected plant extracts (Miliauskas et al., 2004). Flavonoids as one of the most diverse and widespread group of natural compounds are probably the most important natural phenolics (Miliauskas et al., 2004). These compounds possess a broad spectrum of chemical and biological activities including radical scavenging properties (Miliauskas et al., 2004).

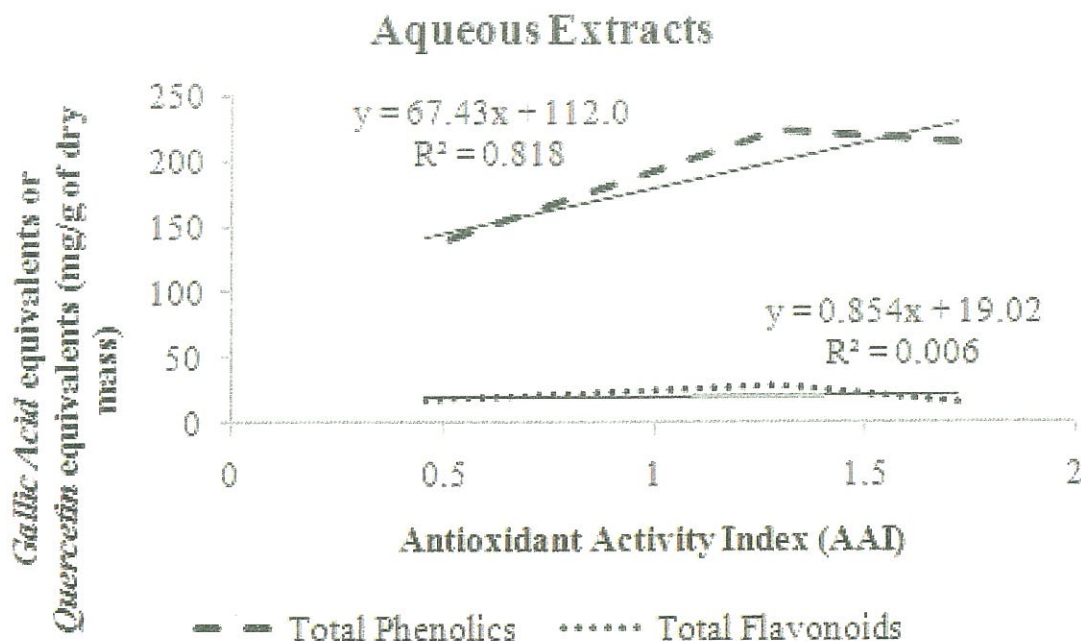
The total phenolic content is very similar among the studied species. Additionally, it seems that the type of solvent does not influence the quantity of phenolics extracted, as it only depends on the type of shrub. However, when extracting flavonoids, it is possible to see that ethanol achieves higher extraction rates than water. It is possible to note that total phenolic composition and flavonoid contents determined in the extracts analyzed are very close to other results found in literature, namely in extracts of *Mellilotus officinalis*, *Equisetum maximum* and *Adiantum capillus-veneris* (Miliauskas et al., 2004;

Silva et al., 2007; Pourmorad et al., 2006).

As summarized in Table 1, all the studied extracts presented radical scavenging capacity, very similar to those reported in the literature (Tawaha et al., 2007; Miliauskas et al., 2004; Silva et al., 2007; Pourmorad et al., 2006; Márquez-García et al., 2009; Scherer and Godoy, 2009; Broinzi et al., 2007; Conforti et al., 2009).

There was a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content for aqueous and ethanolic extracts (Figures 4 and 5); this fact is more obvious for ethanolic extracts. It can be observed that the content of phenolics in the extracts correlates with their antiradical activity; this fact is more obvious for ethanolic extracts, which probably indicates that ethanol isolates phenolic compounds with more pronounced antioxidant properties. Those results suggest that the phenolic compounds contribute significantly to the antioxidant capacity of the investigated shrub species. In addition, those results are consistent with the findings of many research groups who reported such positive correlation between total phenolic content and antioxidant activity (Tawaha et al., 2007; Miliauskas et al., 2004; Silva et al., 2007; Pourmorad et al., 2006). Unexpectedly, there is no correlation between the flavonoids and antioxidant activity of extracts analyzed, as it was mentioned by other authors (Tawaha et al., 2007; Miliauskas et al., 2004; Silva et al., 2007). It is known that only flavonoids of a certain structure and particularly hydroxyl position in the molecule determine antioxidant properties; in general, these properties depend on the ability to donate hydrogen or electron to a free radical (Miliauskas et al., 2004).

It should be noted that extracts of *P. tridentatum* and *C.*



**Figure 5.** Antioxidant activity, total phenolic compounds and total flavonoids of aqueous extracts.

*scoparius* have no significant ability of sequestering free radicals such as DPPH, but have a high degree of inhibition of lipid oxidation (linoleic acid) and sequestration of radicals resulting from its possible oxidation. Moreover, *C. scoparius* aqueous extract presented higher antioxidant properties than the reference BHT, but for very high concentrations.

In conclusion, the present work shows that all the studied extracts presented relevant antioxidant activity and it was observed that a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content.

## REFERENCES

- Aiyegoro A, Afolayan J, Okoh A (2009). *In vitro* antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. J. Med. Plants Res. 3: 462-467.
- Akkol E, Yeşilada E, Güvenç A (2007). Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. J. Ethnopharmacol. 116: 251-257.
- Alim A, Goze I, Goze H, Tepe B (2009). *In vitro* antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss. J. Med. Plants Res. 3: 413-419.
- Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte A (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. Ind. Crops Prod. 30: 165-167.
- Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002). Methods for testing antioxidant activity. Royal Soc. Chem. 127: 183-198.
- Ay M, Bahadori F, Öztürk M, Kolak U, Topçu G (2007). Antioxidant activity of *Erica arborea*. Fitoterapia. 78: 571-573.
- Broinzi P, Andrade-Wartha E, Silva A, Novoa A, Torres R, Azeredo H, Alves R, Mancini-Filho J (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos 27: 902-908.
- Cicco N, Lanorte M, Paraggio M, Viggiano M (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchem. J. 91: 107-110.
- Conforti F, Rosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti G, Uzunov D, Tubaro A, Menichini F (2009). The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. Food Chem. 112:587-594.
- Grosso A, Costa M, Ganço L, Pereira A, Teixeira G, Lavado J, Figueiredo A, Barroso J, Pedro L (2007). Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal. Food Chem. 103:1083-1088.
- Harfani H, Bouanani N, Aziz M, Caid H, Ghalim N, Amrani S (2007). The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. J. Ethnopharmacol. 109: 156-160.
- Kaur C, Kapoor H (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. Int. J. Food Sci. Technol. 37: 153-161.
- Márquez-García B, Fernández M, Córdoba F, (2009). Phenolics composition of *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. Bioresour. Technol. 100: 446-451.
- Miliauskas G, Venskutonis P, van Beek T, (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85: 231-237.
- Nanasombat S, Teckchuen N (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. J. Med. Plants Res. 3: 443-449.
- Nirmal J, Babu C, Harisudhan T, Ramanathan M (2008). Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. BMC Complement. Altern. Med. 8: 15-22.
- Obied H, Bedgood Jr. D, Prenzler P, Robards K (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. Food Chem. Toxicol. 45: 1238-1248.
- Poumorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr. J. Biotechnol. 5: 1142-1145.
- Raja S, Ahamed K, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A,

- Mukherjee P, (2007). Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J. Ethnopharmacol.* 109:41-47.
- Scherer R, Godoy H (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 112: 654-658.
- Silva E, Souza J, Rogez H, Rees J, Larondelle Y (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem.* 101: 1012-1018.
- Sundararajan R, Haja N, Venkatesan K, Mukherjee K, Saha B, Bandyopadhyay A, Mukherjee P (2006). *Cytisus scoparius* link – A natural antioxidant. *BMC Complement. Altern. Med.* 6: 8-14.
- Tawaha K, Alali F, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian species. *Food Chem.* 104: 1372-1378.
- Wang B, Zhang W, Duan X, Li X, (2009). *In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoids* (Rhodomelaceae). *Food Chem.* 113: 1101-1105.

## ***Anexo IV***

---

P. Baptista, C. Gil, M.E. Amaral, F.C Domingues, A.P. Duarte (2008). Antioxidant activity of forest residues extracts. *Revista Portuguesa de Farmácia*, Vol. LII, nº3 (suplemento), 1º Encontro Nacional de Química Terapêutica, ISSN:0484-811X, 62, 13-15 novembro, Porto.

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FOREST RESIDUES EXTRACTS

P. Baptista, C. Gil, M.E. Amaral, F. Domingues, A.P. Duarte

Research Unit of Textile & Paper Materials, University of Beira Interior, 62001-001 Covilhã, Portugal, [apcd@ubi.pt](mailto:apcd@ubi.pt)

### Abstract

The utilization of natural antioxidants as substitutes for the synthetic ones is being widely used because they are considered safer, and several vegetal materials have been considered as sources for their extraction. The Portugal forest area represents around 38% of the territory, which could represent a large quantity of forestry residues, pruning and shrub species. These plants can be used as raw material for achieving high value chemicals, like antioxidants compounds. The present work is a preliminary study about the characterization of solvent extracts of some plant species from Portuguese forest, namely *Pterospartum tridentatum* (known as *carqueja* in Portugal), *Cistus ladanifer* (rock-rose), *Arbutus unedo* (strawberry tree) and a wood species, *Pinus pinaster* (maritime pine).

In the present study, the antioxidant activity of methanolic extracts was evaluated by the determination of the scavenging effect by DPPH method. The results were compared with an antioxidant standard, trolox. In addition, the flavonoid content was determined by a colorimetric method. The results presented in Table 1 indicate that all the essayed extracts displayed radical scavenging activity, although lower than the reference (trolox). The lowest antioxidant activities were presented by *Pterospartum tridentatum*, although the similarity between the flavonoid content of the extracts.

**Table 1.** Characterization of methanolic extracts.

Sample	<sup>1</sup> EC <sub>50</sub> (µg/mL)	<sup>2</sup> T <sub>EC50</sub> (min)	Antiradical efficiency (x 10 <sup>-1</sup> )	Flavonoid content (mg QE/g plant extract)
Trolox	53.47	4.75	39.41	---
<i>C. ladanifer</i>	179.39	9.69	5.76	21.13
<i>P. pinaster</i>	230.03	26.59	1.63	30.29
<i>P. tridentatum</i>	638.11	16.72	0.94	26.91
<i>A. unedo</i>	182.90	13.15	4.16	29.15

<sup>1</sup>Concentration of sample required to scavenge 50% of DPPH free radicals. <sup>2</sup>Time needed to reach the steady state to EC<sub>50</sub> concentration.

### Experimental

The methanol extractions were carried out with a Soxhlet apparatus until the solvent became colourless.

The antioxidant activity was evaluated using the stable 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH) method [1,2]. Eight concentrations (12,5 – 250 µg/mL) of each plant extract were reacted with a methanolic DPPH solution and the kinetics of the reaction was followed. The antioxidant concentration required to inhibit 50% of DPPH free radicals under the experimental conditions (EC<sub>50</sub>) was determined for each plant extract. Trolox was used as standard control. Antiradical efficiency was calculated according to the equation: AE=1/EC<sub>50</sub>.TEC<sub>50</sub>. Flavonoids were determined by aluminium chloride colorimetric method using quercetin for the preparation of calibration curve [3]. All determinations were carried out in duplicate.

### References

- [1] W., Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebnsn.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
- [2] C., Sánchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto, *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *76*, 270-276.
- [3] F., Pourmorad, S.J. Hosseinimehr, N. Shahabimajd, *African J. Biotechnology* **2006**, *5*, 1142- 1145.

## ***Anexo V***

---

N. Gil, C. Gil, M. E. Amaral, A. P. Costa, A P. Duarte (2007). Biorefinação-uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*, *Pasta e Papel*, dezembro 2007, 38-43.

## BIOREFINAÇÃO - USO DE ENZIMAS NO MELHORAMENTO DA REFINAÇÃO DE UMA PASTA KRAFT BRANQUEADA DE EUCALYPTUS GLOBULUS

Nuno Gil<sup>1</sup>, Cristina Gil<sup>1,2</sup>,  
Maria Emília Amaral<sup>1,2</sup>,  
Ana Paula Costa<sup>1,2</sup>  
e Ana Paula Duarte<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Investigação de Materiais Têxteis e Papeiros,

<sup>2</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel,  
Universidade da Beira Interior, 6200-001 Covilhã.

E-mail de contacto: apduarte@ubi.pt

### SUMÁRIO

Dois tipos de misturas comerciais de enzimas, a Celluclast (mistura de celulases) e a Viscozyme L (mistura de beta-glucanase), foram usadas com diferentes dosagens e tempos de reacção, para melhorar a refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. O tratamento enzimático aumenta cerca de 80% o grau Schopper-Riegler (°SR) para o mesmo nível de energia de refinação (1500 revoluções PFI). De modo a avaliar a eventual degradação introduzida pelas enzimas foram determinadas as viscosidades das pastas antes e depois dos tratamentos enzimáticos. Os resultados estão concordantes com os obtidos para o comprimento das fibras, onde apenas ocorreu uma fraca diminuição desta propriedade. Este estudo foi complementado com a quantificação dos açúcares libertados nos filtrados dos tratamentos enzimáticos, antes e depois da refinação. As propriedades de resistência das pastas não foram significativamente afectadas com a aplicação das enzimas, tendo-se mesmo verificado uma melhoria na coesão interna.

**Palavras-chave:** Biorefinação; Enzimas; Pasta de *Eucalyptus globulus*; Hidrólise; Propriedades físicas

### SUMMARY

Two commercial enzymes mix Celluclast (cellulases mixture) and Viscozyme (beta-glucane mixture) were used to improve the refining process of an *Eucalyptus globulus* bleached kraft pulp. This treatment improved the Schopper-Riegler degree (°SR) by up 80% at the same level of refining energy (1500 PFI revolutions). The pulp degradation was evaluated by the pulp viscosity determination, which was in agreement with the fiber length determination that showed a slight diminution with the enzymatic treatment. The carbohydrate determination in the filtrates complemented this study. The strength properties of the pulp were not affected by this treatment, it was even observed an increase in internal cohesion.

**Key words:** Biorefining; Enzymes; *Eucalyptus globulus* Pulp; Hydrolysis; Physical properties

### INTRODUÇÃO

O uso de enzimas na indústria de pasta e papel sofreu um grande desenvolvimento nas duas últimas décadas. As enzimas celulolíticas têm sido intensivamente investigadas e usadas em várias aplicações, embora muitas

áreas ainda estejam em desenvolvimento. A reciclagem do papel é uma área onde a utilização de enzimas tem sido implementada, uma vez que as fibras recicladas podem ser melhoradas através de tratamentos com celulases e hemicelulases. De facto, estas enzimas modificam as propriedades interfaciais das fibras, aumentando a afinidade para a água, o que por sua vez provoca alterações nas propriedades técnicas da pasta e do papel, como a drenabilidade e a resistência (Dienes *et al.* 2004; Oksanen *et al.* 2002; Pala *et al.* 2002). A destintagem de fibras secundárias tem sido outra utilização para estas enzimas (Pèlach *et al.* 2003).

A influência destas enzimas nas fibras de espécies de madeira Portuguesas foi estudada pelo nosso grupo de trabalho (Spiridon e Duarte 2004; Spiridon *et al.* 2001a e b) e os resultados obtidos mostraram que celulases e hemicelulases comerciais influenciavam as propriedades papéis das pastas kraft cruas de *Eucalyptus globulus* e de *Pinus pinaster*. Este grupo de trabalho mostrou ainda que o tratamento das fibras de pastas kraft cruas de *Pinus pinaster* com xilanases comerciais dava origem a um aumento na sua flexibilidade com a consequente melhoria na capacidade de ligação inter fibras (Spiridon *et al.* 2003).

O uso de xilanases como activadores de branqueamento tem sido também uma aplicação biotecnológica na indústria de pasta e papel. O uso destas enzimas aumenta significativamente a branqueabilidade da pasta, uma vez que melhora a acessibilidade dos agentes químicos do branqueamento para as fibras (Roncero *et al.* 2005 e 2000; Shah *et al.* 2000).

O tratamento de fibras provenientes de diversas origens (pastas kraft cruas de resinosas, papel reciclado de cartão canelado) com diferentes celulases e hemicelulases comerciais resulta na redução do consumo energético durante a refinação. Esta economia é conseguida por redução do tempo de refinação para atingir os mesmos níveis de refinação, sem afectar as propriedades de resistência da pasta (Bhardwaj *et al.* 1996). Resultados semelhantes foram encontrados para a xilanase purificada obtida a partir do fungo *Trichoderma reesei* (Wong *et al.* 1999). Estes resultados são mais notórios quando os tratamentos são efectuados em pastas secas em vez de pastas nunca secas (Garcia *et al.* 2002) e os melhores resultados foram encontrados com celulases purificadas em vez de misturas (Pere *et al.* 2000 e 1995).

O consumo de energia na indústria de pasta e papel é elevado, contribuindo em cerca de 18% do custo de produção. Para o desenvolvimento das propriedades pretendidas, uma pasta tem de ser sujeita ao processo de refinação, o qual representa 18% a 25% do total de energia eléctrica requerida para produzir papel (Bajpai *et al.* 2006; Bhardwaj *et al.* 1996). Devido à escassez em ener-

gia disponível e ao elevado custo energético, a conservação de energia tornou-se uma necessidade para a indústria papelreira. Consequentemente, qualquer tratamento à pasta que implique uma diminuição no consumo em energia, nomeadamente no que diz respeito à operação de refinação, terá um efeito benéfico no consumo global de energia na indústria. O uso de enzimas foi também testado numa escala industrial, mostrando que se reduziu o requisito energético em 25 kWh/ton de pasta (Bajpai *et al.* 2006).

Neste trabalho avaliou-se o resultado do tratamento de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* com duas misturas comerciais, uma de celulases e outra de beta-glucanase. O efeito destas enzimas na biorefinação foi avaliado para diferentes dosagens e tempos de reacção em termos de açúcares hidrolisados, propriedades de drenabilidade das pastas e das propriedades físicas das folhas de papel produzidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais.

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* industrial, com uma viscosidade de 853 mL.g<sup>-1</sup>. Usaram-se enzimas comerciais (Novo Nordisk) designadamente a Celluclast 1.5 L, uma mistura de celulases, produzida a partir de uma estirpe seleccionada do fungo *Trichoderma reesei* e a Viscozyme L, mistura de enzimas degradativas dos hidratos de carbono (arabanase, celulase, beta-glucanase, hemicelulase e xilanase) com maior actividade enzimática para a beta-glucanase. A Viscozyme foi produzida a partir de uma estirpe seleccionada do fungo *Aspergillus aculeatus*.

### Tratamento enzimático.

A pasta foi tratada com 1, 2 e 4 UI de celulases (cel) e de beta-glucanase (bgluc) por grama de pasta. Este tratamento foi realizado em sacos de polietileno nas seguintes condições: 5% de consistência, temperatura de 50°C, tempo de reacção de 1 hora (agitação manual de 10 em 10 minutos). O pH da suspensão foi ajustado a pH= 5 para as celulases e a pH = 4,3 para a beta-glucanase, usando uma solução diluída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No caso da beta-glucanase foram ensaiados mais dois tempos de reacção (2 e 4 horas), e o tratamento foi efectuado em copos de precipitação, com agitação mecânica contínua. A reacção foi interrompida por lavagem com água desionizada até pH neutro. A pasta de controlo foi tratada em paralelo e de modo semelhante, sem adição de enzima.

### Caracterização dos açúcares nos filtrados.

Os filtrados dos tratamentos enzimáticos foram evaporados até resíduo seco, e este foi hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

de modo a transformar os eventuais oligossacarídeos em açúcares redutores. A quantificação destes açúcares foi efectuada por determinação espectrofotométrica usando o ácido 3,5-dinitrossalicílico de acordo com o método referido por Miller (1959).

## Caracterização da pasta.

As propriedades morfológicas foram determinadas automaticamente por análise de imagem de uma suspensão diluída que passa numa câmara de fluxo, no equipamento MORFI®. A viscosidade das pastas foi determinada antes e depois do tratamento enzimático, de acordo com a norma ISO 5351/1. Todas as amostras de pasta foram refinadas no refinador PFI com uma consistência de 10% e uma intensidade de refinação de 3,33 N/mm. Posteriormente foram caracterizadas, determinando-se o grau Shopper-Riegler (°SR) de acordo com a norma ISO 5267/1 e o grau de retenção de água WRV (*water retention value*), de acordo com o método referido por Silvy e colaboradores (1968). As folhas laboratoriais foram preparadas de acordo com a norma ISO 5269/1. As propriedades mecânicas e estruturais das folhas foram medidas de acordo com as respectivas normas ISO.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Acção das enzimas.

A acção hidrolítica das enzimas sobre as fibras, foi verificada através da quantificação dos açúcares libertados no filtrado dos tratamentos enzimáticos. A figura 1 mostra os açúcares redutores totais libertados após os pré-tratamentos enzimáticos, indicando que a acção hidrolítica das celulasas é superior à da beta-glukanase, e essa acção aumenta com a dosagem de enzima, como era de esperar.

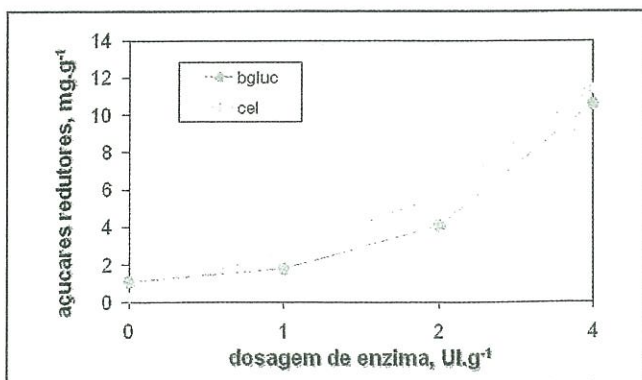


Figura 1 - Açúcares redutores totais libertados por grama de pasta para as diferentes dosagens de enzimas.

Alguns autores consideram a hidrólise da pasta dentro de valores aceitáveis quando esta é menor que 3% (Pere *et al.* 2000). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que essa hidrólise não ultrapassou os 1,1% o que indica

que este tratamento não degradou substancialmente a pasta. A acção hidrolítica sobre as pastas pode também ser estimada ao nível do grau de polimerização da celulose, aqui avaliada através da determinação da viscosidade da pasta (Figura 2).

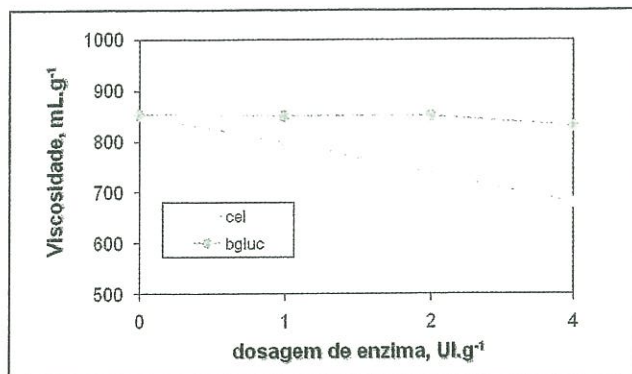


Figura 2 - Viscosidade das pastas em função das diferentes dosagens de enzimas.

Esta figura mostra que a acção hidrolítica das celulasas é mais notória do que a da beta-glukanase, sendo que neste caso praticamente não se observa diminuição, estando concordante com os resultados obtidos para os açúcares. As características biométricas das fibras foram analisadas, a que melhor traduziu a degradação da fibra foi o comprimento, mostrando que, mesmo com a variável refinação, o efeito das diferentes dosagens de enzimas na degradação não foi significativa (Tabela 1). Esta acção das enzimas sobre as fibras irá ser preponderante nos efeitos observados nas propriedades, como veremos posteriormente.

Comprimento médio ponderado em comprimento (mm)								
Dosagem	0 UI		1 UI		2 UI		4 UI	
	cel	bgluc	cel	bgluc	cel	bgluc	cel	bgluc
0 rev. PFI	0,811	0,801	0,809	0,803	0,806	0,804	0,804	0,803
1500 rev. PFI	0,796	0,796	0,773	0,794	0,730	0,794	0,667	0,787

Tabela 1 - Efeito do tratamento enzimático e da refinação no comprimento médio ponderado em comprimento das fibras.

### Efeito do tratamento enzimático na refinação.

O pré-tratamento enzimático, em especial com as celulasas, permite uma melhoria no comportamento da pasta no que respeita ao processo de refinação, em termos de índice de drenagem. Os gráficos da figura 3 mostram um aumento evidente do °SR para as pastas submetidas ao pré-tratamento com celulasas relativamente às não tratadas, este efeito é especialmente visível para as 1500 revoluções, onde se verifica um aumento de 80%.

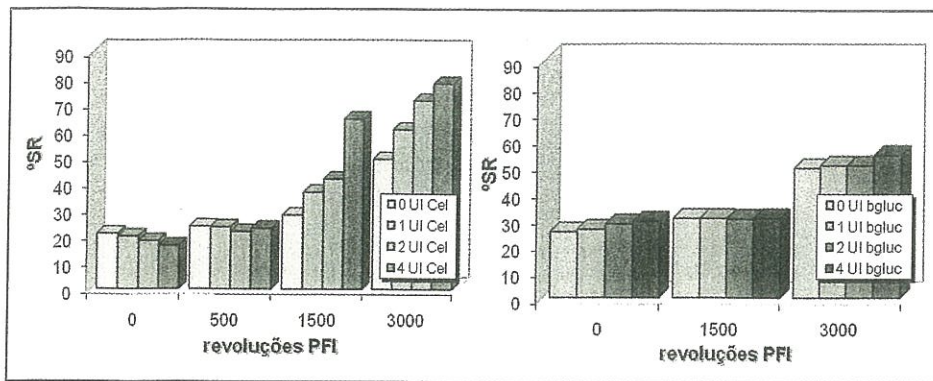


Figura 3 – Evolução do grau Schopper-Riegler (°SR) com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

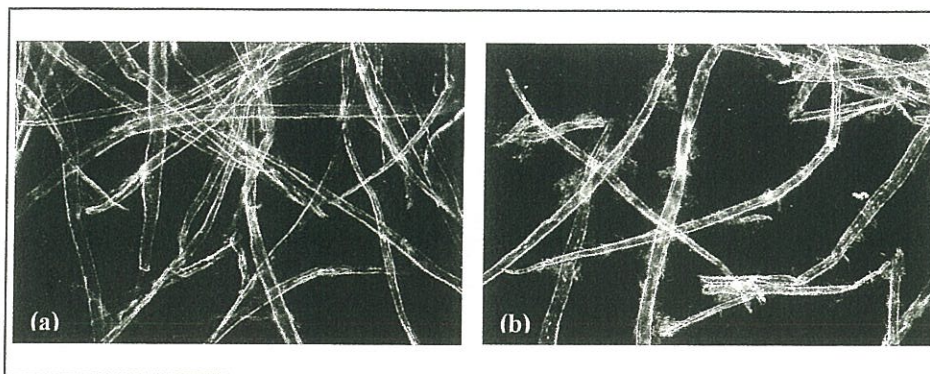


Figura 4 – Microfotografias para a pasta refinada a 1500 rev (a) sem tratamento enzimático, (b) com 4 UI de celulases.

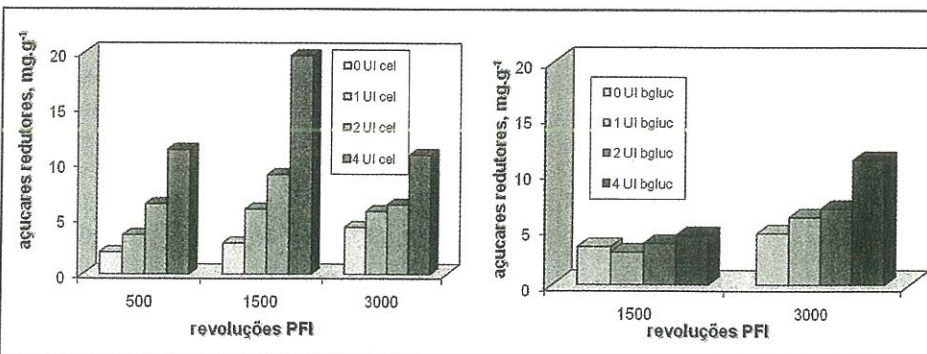


Figura 5 – Evolução dos açúcares redutores totais libertados por grama de pasta com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

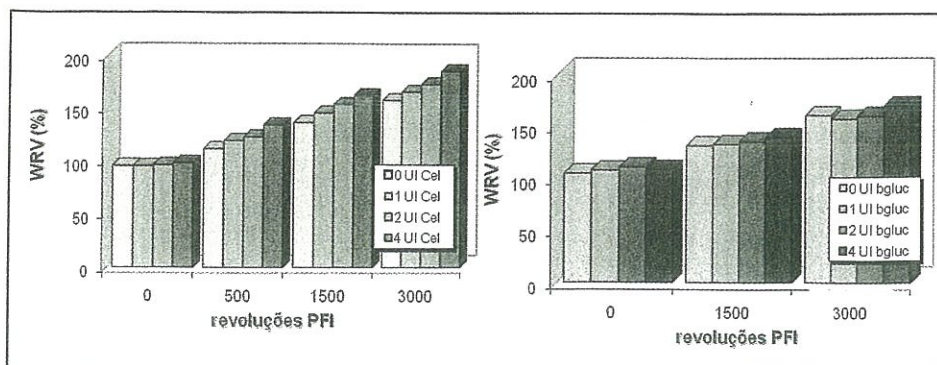


Figura 6 - Evolução do WRV com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

O efeito das enzimas para este grau de refinação pode ser explicado pelo aumento na fibrilação externa provocada pela acção das enzimas, o que é bem visível nas imagens obtidas por microscopia óptica de campo escuro, como se observa na figura 4.

Esta modificação significativa no comportamento da pasta a 1500 revoluções PFI é também observada na libertação dos açúcares durante o processo de refinação e novamente para as celulases, como se pode ver na figura 5. No que respeita à beta-glucanase e para as mesmas revoluções PFI esse efeito não é tão visível, sendo mais evidenciado para as 3000 revoluções PFI. Os açúcares redutores foram determinados num filtrado recolhido após a refinação.

A hidratação da fibra durante a refinação, medida pelo WRV segue a tendência do grau Schopper-Riegler (Figura 6). Para o mesmo tempo de tratamento e nível de refinação, a adição de celulases à pasta mostra um aumento de 17% no WRV, ao passo que para a beta-glucanase o aumento é apenas de 6%. Este efeito mais evidenciado aquando da adição de celulases, resulta provavelmente do facto destas enzimas degradarem mais a parede celular, dando origem a uma maior superfície exposta susceptível de estabelecer ligações com as moléculas de água e assim contribuir para uma maior hidratação.

### Efeito do tratamento enzimático nas propriedades da pasta.

Como foi já referido, a acção das enzimas na degradação das hemiceluloses traduz-se numa maior ou menor degradação das fibras, a qual pode manifestar-se numa deterioração das propriedades físico-mecânicas das pastas. A resistência à tracção (Figura 7) para as pastas tratadas com celulases apresenta uma ligeira melhoria, sendo esta apenas contrariada com o incremento de

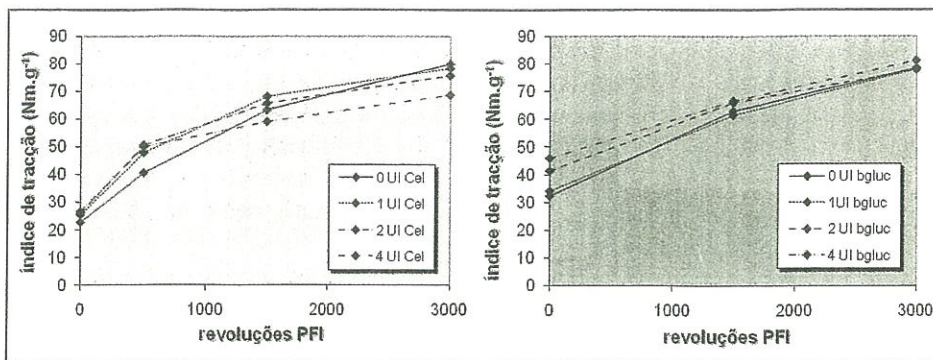


Figura 7 – Evolução da resistência à tracção com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

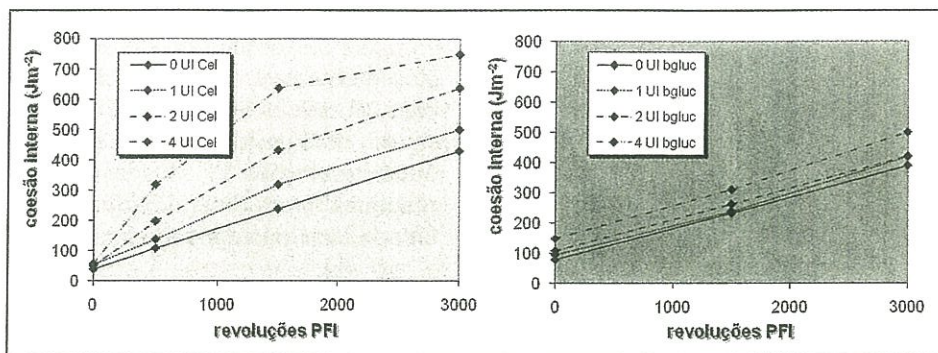


Figura 8 – Evolução da coesão interna com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase.

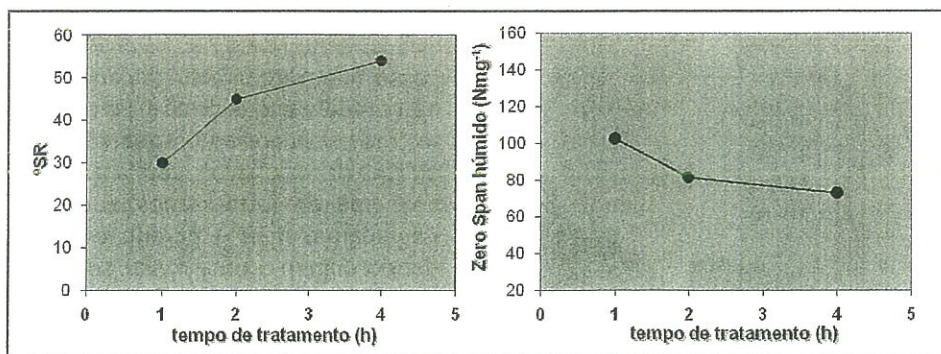


Figura 9 – Evolução do °SR e da resistência à tracção à distância zero (zero span) para a beta-glucanase com diferentes tempos de reacção.

concentração de enzima e de nível de refinação. No caso das pastas tratadas com beta-glucanase a tendência é semelhante, mas os efeitos são menos notórios.

A figura 8 mostra a evolução da coesão interna, observando-se que esta propriedade foi significativamente incrementada pelo tratamento enzimático. Este facto pode ser explicado pelo aumento da fibrilação externa, já anteriormente referido e mostrado na figura 4.

### Efeito do tempo de tratamento nas propriedades da pasta.

No caso da beta-glucanase, foi ainda estudado o efeito do tempo de tratamento, dado que uma hora de reacção

não introduziu grandes alterações. A figura 9 mostra que apesar do efeito benéfico do tempo de reacção sobre o °SR, com um incremento de 57%, ocorreu no entanto uma diminuição de 34 % na resistência intrínseca da pasta.

### CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a biotecnologia pode contribuir de forma positiva para a indústria de pasta e papel. Este trabalho mostrou que a acção de um tratamento enzimático antes da refinação aumenta o índice de drenagem da pasta e o grau de hidratação das fibras, sendo este efeito mais visível no caso da adição das celulases. Este comportamento permite adiantar que para se atingir um determinado grau de refinação, a quantidade de energia a fornecer é menor. O efeito das enzimas ensaiadas sobre as propriedades da pasta, apesar de no caso das celulases se ter observado alguma degradação das fibras, não pode ser considerado nefasto para as propriedades de resistência da pasta, apresentando mesmo um aumento no caso da coesão interna. Para a beta-glucanase o melhor desempenho na refinabilidade surge para tempos de reacção elevados, no entanto a resistência intrínseca da fibra é ligeiramente afectada

## ***Anexo VI***

---

J. Curto, C. Gil, E. Conceição, A. Portugal, R. Simões (2009). Estudo comparativo da incorporação de fibra de Pinus pinaster branqueada no papel de Eucalyptus globulus, Pasta e Papel, Verão 2009, 52-57.

# ESTUDO COMPARATIVO DA INCORPO- RAÇÃO DE FIBRA DE PINUS PINASTER BRANQUEADA NO PAPEL DE EUCALYPTUS GLOBULUS

JOANA CURTO<sup>1</sup>, CRISTINA GIL<sup>1</sup>,  
EDUARDO CONCEIÇÃO<sup>2</sup>,  
ANTÓNIO PORTUGAL<sup>2</sup> e ROGÉRIO SIMÕES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Universidade da Beira Interior,  
Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel

<sup>2</sup> - Universidade de Coimbra,  
Departamento de Engenharia Química  
Email de contacto:

*joana.curto@ubi.pt; rog.simoese@ubi.pt*

## ABSTRACT

Office paper is the principal Portuguese paper industry product. This paper is mainly produced from *Eucalyptus globulus* bleached kraft pulp with a small incorporation of a softwood pulp, called reinforcement pulp, to increase paper strength. Despite *Pinus pinaster* being one of the most important species of the Portuguese forest, with the major forest area, Portugal only recently has begun to produce bleached pine pulp. To evaluate the Portuguese Pine reinforcement potential, the pulp was bleached in the laboratory and compared with a reference softwood market pulp. The Portuguese fibres exhibit higher coarseness (45%), length (13%) and width (15%) than the market pulp. In this study the goal is to quantify the influence of beating degree and long fibres incorporation level on the reinforcement of *Eucalyptus globulus* based paper. The contribution of two reinforcement pulp fibres with different biometry and coarsenesses to the final paper properties is done with an experimental plan that includes the following steps: evaluation of each raw material separately; incorporation of long fibres, using pulps with the same beating revolution number; incorporation of long fibres, using approximately the same beating degree, measured as °SR; evaluation of wet paper strength. The conclusions pointed out that, with the optimal beating, the Portuguese Pine improves tearing and tensile strength of the *Eucalyptus* based paper being possible to obtain equivalent or greater performance than using the market pulp. Paper properties have been found to be non linear in relation to pulp mixture proportions.

## INTRODUÇÃO

Na produção de papel de escritório a função principal da fibra de reforço é aumentar a "runnability" do processo de produção de papel, minimizando a ocorrência de quebras. Sendo esta uma variável de processo, uma das questões que tem que ser analisada é qual das propriedades de resistência melhor se correlaciona com a frequência de quebras. Esta questão foi discutida em várias publicações (Uesaka *et al.* 2001, Niskanen *et al.* 1998), tendo-se utilizado, de uma forma geral, os testes de rasgamento fora do plano para avaliar a capacidade de resistência às quebras. Alguns autores têm evidenciado também a importância de testes de fractura no plano (Niskanen *et al.* 1998, Page e Seth 1982, Van den Akker *et al.* 1967). Os trabalhos publicados indicam que a maior parte das quebras têm origem em pequenas imperfeições na estrutura e em picos de tensão (Moilanen e Linqvist 1996, Roisum 1990, Page e Seth 1982,



PFI e acompanhou-se a evolução do °SR, do tempo de drenagem e das propriedades das folhas laboratoriais. Na tabela 2 encontram-se os valores obtidos para a resistência à drenagem das diferentes pastas e para as propriedades estruturais e mecânicas das folhas laboratoriais isotrópicas das fibras em estudo: eucalipto (Euc), fibra longa comercial (FL) e Pinheiro Bravo nacional (PB).

**Tabela 2 – Valores médios de resistência à drenagem e propriedades das folhas do eucalipto (Euc), da fibra longa comercial (FL) e do Pinheiro Bravo nacional (PB).**

Matéria-prima Rotações no PFI	Euc 0	Euc 1000	Euc 3000	FL 0	FL 1000	FL 3000	PB 0	PB 1000	PB 3000	PB 6000
°SR	21	27	47	15	20	28	13	14	22	53
Tempo de drenagem (s)	3.8	4.3	9.0	3.2	3.8	4.6	2.9	3.0	3.4	5.4
Massa volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	0.56	0.68	0.85	0.58	0.68	0.78	0.57	0.67	0.73	0.77
Permeabilidade ao ar Bendtsen (μ m/P.a.s)	36.7	20.2	2.5	30.0	12.8	2.2	45.7	28.4	5.2	0.3
Índice de tração (Nm/g)	19.0	47.2	74.5	19.1	54.6	75.4	26.8	48.8	75.6	84.0
Alongamento (%)	1.2	2.4	4.0	2.3	3.7	3.9	2.5	3.2	3.8	4.0
Índ. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	3.0	7.2	9.6	12.2	15.2	10.6	21.3	20.8	14.4	12.2
Lisura Bekk (s)	13	37	137	13	45	132	11	34	105	72

Ao fornecer energia mecânica à pasta com a refinação as fibras tornam-se mais flexíveis, a parede externa desenvolve fibrilação e ocorre produção de finos o que permite aumentar as ligações interfibras e aumentar a resistência do papel. No entanto, com o decorrer da refinação aumentam também os efeitos indesejáveis, como por exemplo o corte das fibras e o aumento da resistência à drenagem. Assim a evolução das pastas com a refinação deve ser acompanhada da medição da resistência do papel, onde se verifica um impacto positivo, e da resistência à drenagem onde o impacto é negativo.

Para o presente estudo, um dos resultados mais relevantes da tabela 2 diz respeito ao rasgamento. Para um nível de refinação moderado (1000 rotações PFI), as fibras longas apresentam um desempenho muito superior ao do eucalipto, evidenciando-se também diferenças significativas entre as fibras longas. O Pinheiro Bravo nacional apresenta um índice de rasgamento que é cerca de 2.9 vezes superior ao do eucalipto, enquanto que a fibra longa comercial atinge as 2.1 vezes. Usando como referência o índice de trac-

ção (75 N.m/g; 3000 rotações PFI), a pasta de fibra longa nacional continua a evidenciar melhor rasgamento do que a correspondente comercial. Este comportamento é consistente com o maior comprimento médio da fibra nacional. Apesar deste desempenho, a suspensão da fibra nacional drena mais facilmente. Para obter o mesmo °SR, a pasta nacional requer mais energia na refinação. Estas conclusões são naturalmente válidas para as pastas estudadas. É sabido que a matéria-prima nacional apresenta uma variabilidade considerável, em função da proveniência, o que afecta as características morfológicas médias das fibras. Outro aspecto digno de nota é a relação entre a resistência à drenagem e a permeabilidade ao ar das estruturas de fibras curta e longa comerciais. Para a mesma densidade da estrutura (0.68 g/cm<sup>3</sup>) e, portanto, para a mesma porosidade global, a fibra longa comercial apresenta muito menor permeabilidade ao ar que a correspondente estrutura de fibra curta, colocando em evidência o papel da mor-

fologia das fibras e a sua influência sobre a tortuosidade da estrutura. Os resultados experimentais são perfeitamente compatíveis com a elevada colapsibilidade das fibras comerciais Nórdicas e a baixa colapsibilidade das fibras de eucalipto, mas elevada capacidade de empacotamento. A 3000 rotações, a permeabilidade ao ar das duas estruturas é semelhante, apesar da estrutura de fibra curta apresentar muitíssimo maior resistência à drenagem.

#### **Incorporação de fibra longa comercial com o mesmo número de rotações no PFI**

Para estudar o efeito da incorporação de fibras longas no papel de eucalipto, começou por efectuar-se um conjunto de experiências em que as pastas de eucalipto (Euc) se misturam com pastas de fibra longa comercial (FL) refinadas com o mesmo número de rotações no PFI, usando uma proporção de 90% de eucalipto e 10% de fibra longa. Na tabela 3 incluíram-se também os valores das pastas 100% eucalipto e 100% fibra longa comercial para efeito de comparação.

**Tabela 3 – Resistência à drenagem e propriedades das folhas laboratoriais de pastas de eucalipto com 10% de incorporação de fibra longa comercial (FL).**

Matéria-prima	100% Euc 1000	100% FL 1000	90%Euc 1000 10%FL 1000	100%Euc 3000	100%FL 3000	90%Euc 3000 10%FL 3000	90%Euc 6000 10%FL 6000
°SR	27	20	27	47	28	47	85
T. drenagem (s)	4.3	3.8	5.0	9.0	4.6	9.0	65.0
M. volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	0.68	0.68	0.69	0.85	0.78	0.79	0.91
Perm. Bendtsen (µm/Pa.s)	20.2	12.8	19.0	2.5	2.2	1.5	0.03
Í. tracção (Nm/g)	47.2	54.6	48.0	74.5	75.4	78.4	80.5
Alongamento (%)	2.4	3.7	2.6	4.0	3.9	4.3	4.7
Í. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	7.1	15.2	9.2	9.5	10.6	9.3	9.1
Lisura Bekk (s)	37	45	34	137	132	131	285

Pode verificar-se que o eucalipto refina e densifica muito mais rapidamente que a fibra longa comercial, apresentando um valor de °SR 68% superior ao da fibra longa para as 3000 rotações em PFI, o que sugere um desenvolvimento muito significativo da fibrilação externa. A maior resistência à drenagem do eucalipto, para o mesmo número de rotações, está também fortemente determinada para maior capacidade de empacotamento das fibras curtas. Com o aumento da refinação a diferença entre o eucalipto e a fibra longa acentua-se. Enquanto que a 1000 rotações, o incremento do °SR (face à pasta não refinada) é semelhante, para 3000 rotações a diferença de incremento percentual é significativa (86.6% versus 123.8%). A pasta de mistura drena com as mesmas características do eucalipto, não se observando uma influência significativa da adição da fibra longa no valor do grau Schopper Riegler nem no tempo de drenagem. Para 1000 rotações, verifica-se que as folhas de fibra longa são mais resistentes e a sua incorporação a uma taxa de 10% faz aumentar a resistência das folhas de eucalipto em 2% para a tracção e 33% para o rasgamento. Para 1000 rotações obtêm-se folhas com a mesma massa volúmica para as fibras longa e curta e ligeiramente superior para a mistura, o que pode indicar algum efeito de empacotamento. Nas 3000 rotações, a incorporação de fibra longa diminui muito significativamente a densidade da estrutura fibrosa; i.e. melhora o volume mássico do papel à base de eucalipto. Ainda assim, verifica-se um efeito sinérgico positivo na resistência à tracção e no alongamento. Pelo contrário,

o rasgamento vê-se ligeiramente prejudicado. Para as 3000 rotações a lisura da estrutura não se viu significativamente afectada, tendo diminuído ligeiramente para a refinação com 1000 rotações. A permeabilidade ao ar diminui com a incorporação de fibra longa comercial.

### **Incorporação de fibra longa comercial e Pinheiro Bravo nacional com o mesmo nível de refinação**

Nesta secção e na seguinte faz-se o estudo comparativo da incorporação das duas fibras de reforço objecto do estudo. Para este efeito, escolheu-se como pasta de base a pasta de eucalipto refinada a 1000

rotações no PFI (27°SR) e incorporou-se pasta de fibra longa comercial com 3000 rotações (28°SR) ou pasta de Pinheiro Bravo Nacional com 3000 rotações (22°SR) ou ainda pasta nacional com 6000 rotações no PFI (53°SR). Testaram-se dois níveis de incorporação, 10 e 20%, tendo-se verificado que a resistência à drenagem é semelhante para todas as suspensões. Os resultados obtidos constam da tabela 4. No que diz respeito ao efeito da incorporação sobre a densidade da estrutura, verifica-se uma densificação da estrutura para ambas as pastas de reforço. A fibra nacional conduz, no entanto, a estruturas fibrosas mais permeáveis ao ar, em consonância com os dados da tabela 2 (FL 3000 e PB 3000).

**Tabela 4 – Resistência à drenagem e propriedades das folhas laboratoriais de pastas de eucalipto (Euc), com 10% e 20% de incorporação de fibra longa comercial (FL) e Pinheiro Bravo nacional (PB).**

Matéria-prima	Euc 1000	90%Euc 1000 10%FL 3000	80%Euc 1000 20%FL 3000	90%Euc 1000 10%PB 3000	80%Euc 1000 20%PB 3000	90%Euc 1000 10%PB 6000	80%Euc 1000 20%PB 6000
°SR	27	27	28	27	28	29	32
T. drenagem (s)	4.3	4.6	4.8	4.4	4.4	4.6	4.9
M. volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	0.68	0.72	0.73	0.71	0.73	0.73	0.73
Perm. Bendtsen (µm/Pa.s)	20.2	12.2	6.7	17.4	8.3	7.9	5.0
Í. tracção (Nm/g)	47.2	55.0	56.5	54.0	57.0	56.8	60.6
Alongamento (%)	2.4	3.2	3.9	3.0	3.1	3.3	3.5
Í. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	7.16	9.36	9.71	9.68	10.20	9.16	10.73
Lisura Bekk (s)	37	52	56	43	60	56	59

Na tabela 5 quantifica-se o efeito da incorporação das fibras de reforço nas propriedades mais relevantes do papel. Em primeiro lugar, é de realçar o impacto muito significativo das fibras de reforço na resistência à tracção, no alongamento e na resistência ao rasgamento. Verifica-se que o maior aumento na resistência à tracção (28%) e rasgamento (50%) ocorre com a incorporação de 20% de Pinheiro Bravo fortemente refinado e o maior aumento de alongamento (62%) para a fibra longa comercial, também a 20% de incorporação. Para níveis de refinação comparáveis, e considerando globalmente as propriedades relevantes, não há diferenças significativas entre as duas fibras de reforço objecto deste estudo. Os resultados da Tabela 5 mostram, ainda, que a resposta não é directamente proporcional ao teor de fibras longas.

**Tabela 5 – Percentagem de variação das propriedades de resistência do papel de eucalipto reforçado, relativamente ao não reforçado.**

Varição em relação a Euc 1000 (%)	90%Euc 1000 10%FL 3000	80%Euc 1000 20%FL 3000	90%Euc 1000 10%PB 3000	80%Euc 1000 20%PB 3000	90%Euc 1000 10%PB 6000	80%Euc 1000 20%PB 6000
Í. tracção (Nm/g)	16.5	19.7	14.4	20.8	20.3	28.4
Alongamento (%)	32.1	62.5	25.0	29.2	37.5	45.8
Í. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	30.7	35.6	35.2	42.45	27.9	49.9

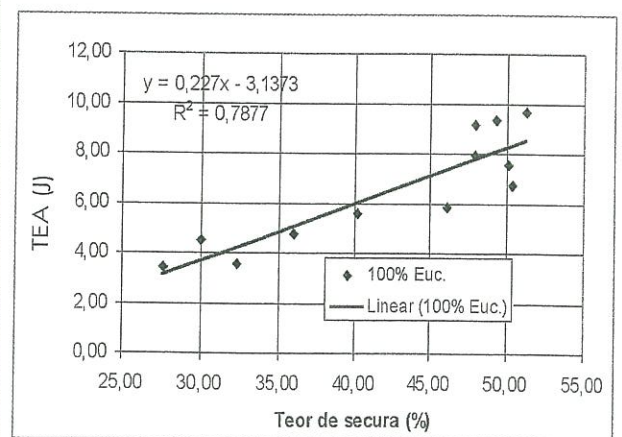
Na tabela 6 quantifica-se o efeito do nível de refinação do eucalipto e da fibra de reforço e ainda o da percentagem de incorporação. O aumento do nível de refinação do eucalipto de 1000 para 3000 rotações no PFI é o factor que mais faz variar a resistência à tracção e tem um efeito muito significativo sobre o rasgamento, embora à custa de um aumento impraticável da resistência à drenagem. Para as misturas de pastas, verifica-se que para as pastas reforçadas com fibra longa comercial, o aumento do nível de refinação desta pasta de 1000 para 3000 é o factor com maior percentagem de variação da resistência à tracção (14,6%), enquanto que a mudança de percentagem de incorporação de 10 para 20% apenas faz aumentar essa resistência em 2,7%. Quando a fibra de reforço é o Pinheiro Bravo nacional, tanto a refinação como a percentagem de incorporação contribuem para o aumento da resistência à tracção com valores próximos, entre os 5 e os 7%.

**Tabela 6 – Efeito da refinação do eucalipto, da refinação da fibra de reforço e da percentagem de incorporação na variação da drenagem e das propriedades de resistência do papel em estado seco.**

Factores	Refinação do Eucalipto	Refinação da Fibra Longa (10% inc.)	Incorp. Fibra Longa 3000	Refinação Pinheiro Nacional (10% inc.)	Refinação Pinheiro Nacional (20%inc.)	Incorp. Pinheiro Nacional 3000	Incorp. Pinheiro Nacional 6000
Situação de referência	Euc 1000	90%Euc 1000 10%FL 1000	90%Euc 1000 10%FL 3000	90%Euc 1000 10%PB 3000	80%Euc 1000 20%PB 3000	90%Euc 1000 10%PB 3000	90%Euc 1000 10%PB 6000
Situação final	Euc 3000	90%Euc 1000 10%FL 1000	80%Euc 1000 20%FL 3000	90%Euc 1000 10%PB 6000	80%Euc 1000 20%PB 6000	80%Euc 1000 20%PB 3000	80%Euc 1000 20%PB 6000
	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)
°SR	74.0	0	3.7	9.4	14.3	5.7	1.03
T. drenagem (s)	1.2	7.7	3.0	2.9	11.1	0	7.9
M. volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	25	4.3	1.4	2.8	0	2.8	0
Perm. Bendisen (µm/Pa.s)	-87.6	-35.8	-49.9	-54.6	-39.3	-52.4	-36.4
Índice tracção (Nm/g)	57.8	14.6	2.7	5.2	6.3	5.6	6.7
Alongamento (%)	66.7	21.9	23.0	3.3	12.9	3.3	6
Índ. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	33.3	-1.6	3.7	-5.4	5.2	-5.4	17.4
Lisura Bekk (s)	270	52.9	7.6	30.2	-1.7	30.2	5.3

#### Resistência em húmido

Considerando que uma das áreas críticas para as quebras é a secção de prensas, onde o teor de sólidos pode variar entre 30 e 50%, analisou-se o desempenho das folhas em estado húmido. Nas figuras 1 e 2 representa-se o valor da energia absorvida por um provete de 25 mm de largura e 100 mm de comprimento até ao ponto de ruptura, quando traccionado a uma velocidade de 10 mm/min, para diferentes teores de sólidos dos provetes.



**Figura 1 – TEA vs teor de sólidos, para o eucalipto.**

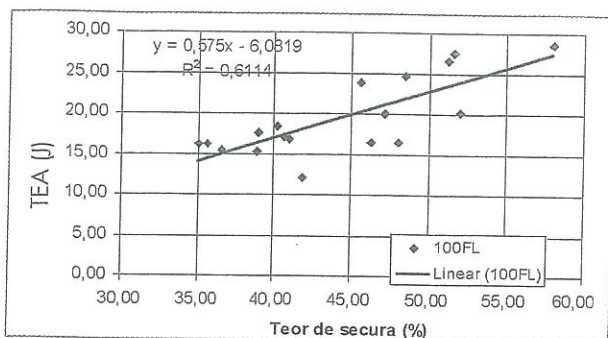


Fig. 2 : TEA vs teor de sólidos, para a fibra longa comercial.

Para um intervalo de teor de sólidos de 40 a 45% e papéis com uma gramagem de cerca de 60 g/m<sup>2</sup>, o eucalipto apresenta um TEA (Tensile Energy Absorption) de 6 a 7 J, o Pinheiro Bravo de 17 a 21 J e a fibra longa comercial de 16 a 20 J. Estes dados experimentais evidenciam, desde logo, a grande debilidade das estruturas fibrosas húmidas de eucalipto face às correspondentes estruturas de fibras longas.

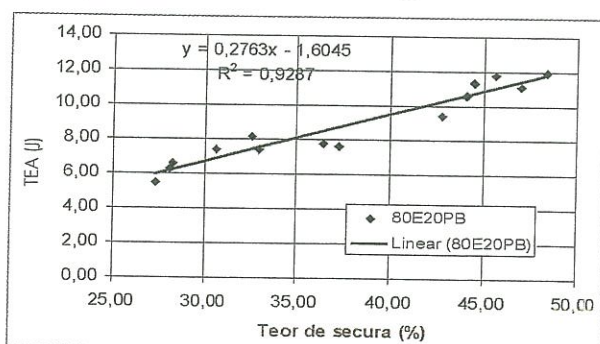


Fig. 3: TEA vs teor de sólidos, para 20% de Pinheiro Bravo

Nos papéis com incorporação utilizou-se eucalipto refinado a 1000 rotações com 27 °SR, fibra longa comercial refinada a 3000 rotações com 28 °SR e Pinheiro Bravo nacional refinado a 4000 rotações com 25 °SR. Testaram-se dois níveis de incorporação, podendo concluir-se que no intervalo de

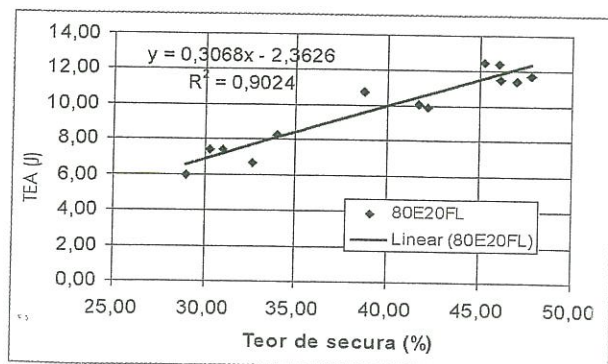


Figura 4 - TEA vs teor de sólidos, para 20% de fibra longa comercial.

teor de sólidos de 40 a 45% o eucalipto reforçado com 20% de Pinheiro Bravo apresenta um TEA de 9.5 a 12 J e reforçado com fibra longa comercial de 10 a 11.5 J (Figuras 3 e 4). Para 10% de incorporação e a mesma gama de teor de sólidos obtém-se TEA de 8 a 9.5 J para o Pinheiro Bravo e 8 a 9 J para a fibra longa comercial.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu confirmar que as fibras de pinho nacional são ligeiramente mais compridas e apresentam maior massa linear do que a generalidade das fibras de softwood comerciais. Estas características morfológicas fazem com que o aumento da resistência à drenagem, tradicionalmente usada como uma medida da refinação, seja mais lento para a fibra nacional. O efeito da incorporação de fibra longa sobre a densidade da estrutura fibrosa mista e das suas propriedades em estado seco dependem dos níveis de refinação das pasta de fibra curta e longa. Porém, para um nível moderado de refinação da fibra curta (27°SR), a incorporação tem sempre um efeito muito positivo sobre as resistências à tracção e ao rasgamento, bem como sobre o alongamento à ruptura. O estudo do comportamento à tracção do papel na gama de teor de sólidos entre 30 e 50% mostrou o impacto muito positivo da incorporação sobre a energia absorvida pelo material até sofrer ruptura. Além disso, não se observaram diferenças significativas entre as duas fibras de reforço objecto do estudo: uma fibra de reforço comercial e o pinho nacional branqueado em laboratório.

## BIBLIOGRAFIA

- Mohlin, U-B., Wennberg, K., *Tappi J.* **67**, 1984, 1, 90-93.  
 Moilanen, P., Linqvist, U., *Tappi J.* **79**, 1996, 9, 88-94.  
 Niskanen, K., Kajanto, I., Pakarinen, P., Paper structure. Paper Physics. Ed. K. Niskanen, Finnish Paper Engineers' Ass. TAPPI, Jyväskylä, Finland, 1998. 14-53.  
 Page, D.H., Seth, R.S., *Tappi J.* **65**, 1982, 8, 92-95.  
 Parsons, S.R., *Tappi J.* **52**, 1969, 7, 1262-1266.  
 Retulainen, E., D.Sc. (Tech) thesis. HUT, Lab. of Paper Technology, Reports, Series, A 7. Espoo, Finland, 1997.  
 Roisum, D.R., *Tappi J.* **73**, 1990, 2, 101-106.  
 Sears, G.R., Tyler, R.F., Denzer, C.W., *Pulp and Paper Magazine of Canada* **66**, 1965, 7, T351-T360.  
 Uesaka, T., Ferahi, M., Hristopulos, D., Deng, N., Moss, C., *The Science of Papermaking*, Transactions of the 12th, FRS, Oxford, England, 2001.  
 Van den Akker, J.A., Wink, W.A., Van Eperen, R.H., *Instrumentation studies LXXXIX*, *Tappi* **50**, 1967, 9, p. 466-470.

## ***Anexo VII***

---

E. Rubio, C. Gil, A P. Duarte, N. Belgacem (1998). Residual ligninof unbleach kraft pulps from Pinus Pinaster: Isolation and characterization. Proceedings of the Chemical Technology of Wood Pulp and Paper Conference, 300-305, 23-25 June, Bratislava, Slovaquie

Faculty of Chemical Technology  
Slovak University of Technology

Department of Chemical Technology of Wood, Pulp and Paper

**Chemical Technology of Wood, Pulp and Paper  
(Raw-materials - Technologies - Products)**

the conference

organised on the occasion  
of the **55<sup>th</sup>** anniversary  
of Teaching and Research in Chemical Technology of Wood,  
Pulp and Paper on the CHTF STU

**Proceedings of conference**

June 23 - 25 , 1998  
Bratislava

---

## RESIDUAL LIGNIN OF UNBLEACHED KRAFT PULPS FROM *Pinus pinaster* : ISOLATION AND CHARACTERISATION

Rubio E., Gil C., Duarte A. P. and Belgacem M. N.  
Universidade da Beira Interior, Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel, 6200  
Covilhã, Portugal

### ABSTRACT :

Residual lignin from industrial unbleached kraft pulps of *Pinus pinaster* (RLKP) was isolated by a mild procedure consisting on the acidolysis of the extractive-free pulps with 0.1 N solution of HCl in dioxane:water under reflux. About 43% of the residual lignin, as determined by classical Klasson method, were isolated and characterized by FTIR and elemental analyses. The residual sugars linked to the extracted RLKP were hydrolyzed by trifluoroacetic acid and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). Lignin was also characterized by degradation method which consisted on submitting it to oxidation by potassium permanganate and identification of the ensuing fragments with a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (GC-MS). The chemical structure established by all above mentioned analyses, as well as the nature and the content residual sugars were found to be in good agreement with data reported in literature for other common softwood species.

### INTRODUCTION

The structure of lignin is a topic which has attracted scientists the last decades and even though the fact that an appreciable quantity of work has been done in this area, the chemical structure of this natural network remains not totally established and not fully understood. The publication of recent books devoted to the comprehensive tentatives in lignin structures and the method of establishing its structure testifies the importance of this subject (1-4). The complexity of the structure of this macromolecule originates from the fact that, it varies with the vegetal species, the stage of maturity, the season, the geography in which the vegetal is growing etc... In addition, as with all crosslinked polymer, all structural analyses which are usually carried out in solution can not be applied, which reduces drastically the possibilities of

complete characterisation of these type of polymers, in general, and lignin in the present context.

In Portugal, the only softwood used as a source of pulps is *Pinus pinaster* which is used to produce unbleached kraft pulps. The bleachability of these pulps appeared to be harder than for other kraft pulps from pines. The chemical structure of residual lignins can give appreciable information about the nature of the chromophore groups and can explain the difficulties related to the removal of these fragments.

In our laboratory, we are engaged in a large program of on *Pinus pinaster*. We are studying its chemical composition, the structure of its various components, the origin of pulp coloration and other aspect related to *Pinus pinaster*.

The aim of this paper is the isolation and characterisation of residual lignin from unbleached kraft pulps from *Pinus pinaster*. In fact, the isolated RLKP was characterised by elemental analyses, FTIR spectroscopy and by degradation with potassium permanganate and identification of the ensuing fragments by GC-MS. The residual sugars were also quantified using HPLC. The results obtained were systematically compared with those determines previously for milled wood lignin of softwood (MWLS) (5), except for the results of GC-MS.

## EXPERIMENTAL PART

Unbleached kraft pulps of *Pinus pinaster* were obtained, in our laboratory, by conventionnal kraft cooking of wood chips, which were generously supplied by Protucel Tejo. These pulps were submitted to soxhlet extraction with acetone and methylene chloride, successively, for 8 hours each solvent. The RLKP was then isolated by a mild procedure consisting in the acidolysis treatment of the extractive-free pulps with 0.1 N solution of HCl in dioxane:water (82:18 v/v) under reflux for 2 hours. About 43% of residual lignin, as determined by classical Klasson method, were extracted and recovered centrifugation, filtration and washing of the precipitate. The ensuing lignin was then dried at 40°C under vacuum and kept in a well sealed capsule. The elemental analyses of lignin was determined by the Instituto Superior Técnico of Lisbon. The FTIR spectra were recorded on a Mattson 5000 spectrometer using pellets of KBr. The pellets were prepared by mixing about 0.5 mg of lignin with 100 mg of KBr. The residual sugars were hydrolysed by trifluoroacetic acid and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC used was a Perkin Elmer 250 chromatograph equipped by refractive index detector (HP 1074A, from Hewlett

Packard) and a commercial column ("Polysphere OH-PB" from Merck Co.). This column is filled by an organic support and is based on cationic ion-exchange principle of separation ( $Pb^{++}$ ). The flow rate of the eluent was 0.4 ml per minute and the column was kept at 80°C. Before starting measurements, a curve of calibration of the most common sugars contained in wood were established. For this purpose, high purity commercial (Merck Co.) D-glucose, L-arabinose, D-galactose, D-xylose and D-mannose were used.

Lignin was also characterized by degradation methods which consisted on its oxidation with potassium permanganate, as described in the literature (2). The alkylation agent used was dimethylsulfate and the solvent was a mixture of dimethoxyethane-methanol-water with the proportions given by Dence (2). The GC-MS used was Fison GC-8000 series with an MS Trio 1000, equipped with a silica fused capillary column (DB-5) and a flame ionisation detector. The separation conditions were the following:

- injection port temperature: 250°C,
- initial oven temperature: 150°C for 0 min,
- temperature rise: 5°C/min.,
- final temperature: 270°C for 7 min.
- the potential of ionisation of the source was 70 eV.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Elemental Analyses:*

The calculated values for RLKP are 63.3, 29.4, 6.0 and 1.0% for C, O, H and S respectively. These values were slightly different than those reported for MWLS (5). In fact Duarte (5) has studied MWLS and found 59.9, 34.5, 5.6 and 0% for C, O, H and S, respectively. Whereas the presence of 1% of sulfur in RLKP sample is obvious, since the pulping process is the conventional kraft cooking, the higher value of the amount of carbon atoms and the lower content of oxygen are less easy to explain. This divergence can be related to the fact that for the MWLS the lignin is practically native and it does not suffer from any chemical degradation, whereas for RLKP could be submitted to some demethoxylation during the cooking process. Moreover, the content of residual sugars was much higher for MWLS, as discussed below. It is also worth noting that the data obtained by Duarte (5) are for more common softwood. In our experience, the *Pinus pinaster* is a softwood having its own specificity.

### *FTIR Analyses:*

The FTIR spectra of RLKP and that of MWLS appeared to be very similar in term of the presence of main bands and their intensities, namely:

- (i) band at around  $3415\text{ cm}^{-1}$ , which is attributed to the OH groups,
- (ii) band between  $2850$  and  $3000\text{ cm}^{-1}$ , representing CH,  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$  moieties,
- (iii) band at  $1560$ - $1685\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to various C=O functions,
- (iv) band at  $1510\text{ cm}^{-1}$ , which witnesses about the presence of guaiacyl groups (G),
- (v) band at  $1460\text{ cm}^{-1}$ , representing  $\text{CH}_3$  groups,
- (vi) band at  $1425\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to CH vibration of aromatic rings,
- (vii) band at  $1220\text{ cm}^{-1}$ , which corresponds to C-O-C bridges,
- (viii) band at  $1140\text{ cm}^{-1}$ , which represents G groups,
- (ix) band at  $1035\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to aromatic cycle "breathing",
- (x) band at  $850$  and  $810\text{ cm}^{-1}$ , which are specific to 2,5,6-substituted aromatic ring.

The only difference which was observed concerns the intensities of bands at  $1425$  and  $1057\text{ cm}^{-1}$ , which were slightly different.

### *HPLC Analyses:*

The nature and the content of residual sugars linked to the extracted RLKP was also determined. The values calculated using the curve of calibration are given in Table I, which gives also, for comparison, values obtained by Duarte (5) for MWLS.

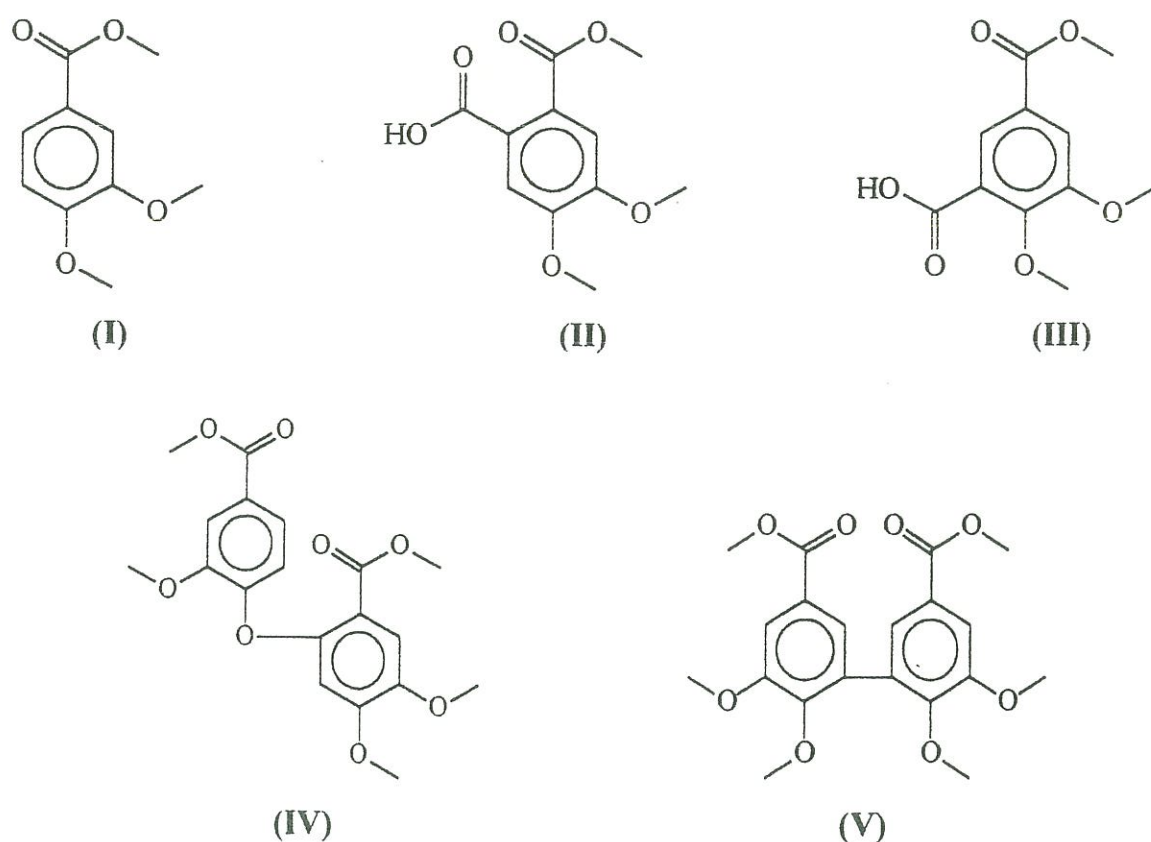
**Table I.** Residual sugars and their content for RLKP and MWLS (5), obtained by their hydrolysis with trifluoroacetic acid and quantified by HPLC.

Sugars	RLKP	MWLS (5)
glucose	1.1	1.9
xylose	1.7	1.6
galactose	0.5	1.5
arabinose	traces	0.5
mannose	0.6	1.5
total	3.9	7.0

The main conclusion which can be drawn from these results concerns the relatively high content of glucose and xylose, which indicate that for *Pinus pinaster*, the two sugars which are the most closely linked to RLKP are these two sugars. This corroborates quite well with literature data (5-7), at least for glucose and xylose.

#### GC-MS Analyses:

The RLKP was also characterised by degradation method which consisted on its oxidation with potassium permanganate. But, before the hydroxy function (both phenolic and aliphatic) contained in RLKP were protected by alkylation with dimethyl sulfate, in order to avoid their oxidation. The oxidised fragments were then derivatised by esterification with diazomethane. The chemical structure of the main fragments obtained by the oxidation of RLKP were established by GC-MS and are given in Scheme I.



Scheme I

The first compound (I) arises from the so-called non-condensed guaiacyl end groups of the lignin macromolecules, whereas the rest (II-V) belong to the different lignin condensed units having substitution at 5 or 6 positions. These structures are in total agreement with those given by Dence (2) for softwoods. The relative proportion of each component is in progress, since few structure are available commercially.

## CONCLUSIONS

This investigation is the first insight into the isolation and the characterisation of lignin from *Pinus pinaster*. These results are encouraging and open the way to more detailed analyses of this not yet fully investigated vegetal, which has a capital importance for the pulp and paper industry of Portugal.

## Aknowledgement:

Authors wish to thank the CEE for their financial support of this work which has been carried out in the frame of Erasmus-Socrates Program and Portucel Tejo for their kind gift of wood sample.

## REFERENCES:

1. G. F. Zakis, "*Functional Analysis of Lignins and Their Derivatives*", Tappi Press, Atlanta, GA, 1994.
2. , (S. Y. Lin and C. W. Dence, "*Method in Lignin Chemistry*" Springer Series in Wood Science, 1992.
3. K. V. Sarkanen, C. H. Ludwig, "*Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reaction*", Wiley-Interscience, New York, 1971.
4. W. G. Glasser and S. Sarkanen, "*Lignin: Properties and Materials*", ACS Symp. Series # 397, American Chemical Society, Washington, DC, 1989.
5. A. P. Duarte, PhD thesis, University of Beira Interior, Portugal, 1996.
6. C. Schwager, O. Faix, J. O. Metzger and J. Puls, "*Investigation on Lignin-carbohydrate complexes*", 3rd European Workshop on Lignocellulosics and Pulps. Stockholm, Sweeden, 1994.
7. R. F. Helm and K. Li, "*Synthesis and rearrangement reactions of lignin-uronic acid model compounds related to hardwood cell wall structure*", 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Helsinki, Finland, 1995.

## ***Anexo VIII***

---

A. Vaz, C. Gil, R. Simões, J. Silvy (2006). The effect of shear rate on apparent viscosity for different pulp suspensions, 5th International Conference on Mechanics and Materials in Design, 329-330, 24-26 julho 2006, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.

REF: A0739.0045

## THE EFFECT OF SHEAR RATE ON APPARENT VISCOSITY FOR DIFFERENT PULP SUSPENSIONS

A. Vaz<sup>1</sup>, C. Gil, R. Simões, and J. Silvy

Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel

Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros, Universidade da Beira Interior

Covilhã, Portugal

Email: <sup>(1)</sup>[avaz@ubi.pt](mailto:avaz@ubi.pt)

### SYNOPSIS

The goal of this work was to study the relationship between chemical pulps suspensions rheology and the operating variables of beating for three different paper fibres, namely *Pinus sylvestris*, *Eucalyptus globulus* and *Betula verrucosa*. It was intended to establish the best conditions for the refining of chemical pulps for paper production. In order to obtain that, the hydromechanics of the beating was analysed for the three pulps. So, the normal and tangential forces were evaluated, the distance between rotor and stator was measured and the pulp apparent viscosity evolution during refining was calculated. The refining essays took place in a laboratory Valley refiner, and the studied variables were the *charge on the roll*, the *rotor speed of rotation* and the *specific applied energy*. The following adaptations to the Valley were made: a rotor speed of rotation variation controller, a sensor to measure the distance between rotor and stator and an electrical power consumption meter. A global relationship between the apparent viscosity and the shear rate was finally obtained.

### MATERIALS AND METHODS

The disintegration of the pulp was made in a Lamor pulper working at 1200 rpm for 20 minutes at room temperature, at a consistency of 3,6%. The beatings were made in a laboratory Lorentzen & Wettre Valley beater, at a consistency of 1,56% and an initial temperature of 20°C. These equipment are shown in Figure 1.



Figure 1 Valley beater and pulper.

The required characteristics for the Valley laboratory beater are normalised in TAPPI T200 sp-96. Figure 2 gives a schema of the details of this equipment. It can be seen that the equipment has an oval basin with a volume of 25 litres, where the pulp flows due to the rotor movement. The pulp passes through the space between the rotor bars and stator bars, where the fibres are subject to normal and tangential forces. It can be seen that a vertical force is exerted in this space, as the action of a weigh is transmitted through a lever.

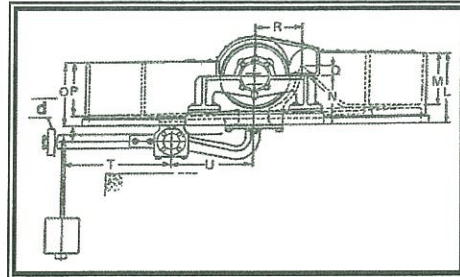


Figure 2 Valley beater schema (Source: Tappi T200 sp-96, 1996)

One Altivar speed variation device was adapted to the beater, so the standard 500-rpm rotor speed of rotation could be changed. Another adaptation was that of the online device MDGE (Espírito Santo, 2001) which measures the effective power with a relative error smaller than 2%. The signals were acquired every 375µseconds and the software integrated the values for the interval of 0,06 seconds. For the treatment of results sixty seconds averages were made. The average gap between the rotor bars and stator bars were evaluated adapting a Sensorex LVDT (linear variable differential transformer) transducer with a connection to a Kosmos RS232C and a signal acquisition software developed for this purpose. The measurement uncertainty was 1 µm and its linearity was ±0,23%.

## THEORETICAL PRINCIPLES

Ebeling (1980) defines refining as “the process of creating desired structural changes in the cell walls of the fibres at the expenditure of mechanical energy”. These modifications permit the attainment of the structural characteristics of a paper grade with specific desired properties and behaviour. The principle of the refiner lies on the treatment of the fibres between opposing stationary and moving bars in the presence of water (Lumiainen, 2000). Rance e Steenberg published in 1951 results, where the refining was analysed as a lubrication process of a journal bearing (Ebeling, 1980). The goal of lubrication is the reduction of friction, wearing and heating of the machine elements which are moving. The refiners can be considered one journal bearing, where the film of fibre suspension acts as a lubricant between the rotor and stator.

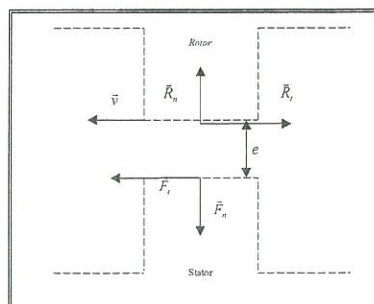


Fig. 3 Hydromechanical model of refining.

Based on this model, it is possible to make a hydromechanical analysis of the process (represented in figure 3), evaluating the tangential and normal forces developed in the gap between the rotor and the stator, and afterwards calculating the apparent viscosity (Vaz, 2005).

The average normal force in the gap is calculated using the principle of equilibrium of forces on a lever, which eventually gives:

$$F_n = m * g * \left( \frac{T}{U} \right) \quad (\text{Equation 1})$$

in which  $F_n$  (N) is the average normal force in the gap,  $m$  (N) is the mass applied on the lever,  $g$  ( $ms^{-2}$ ) is the gravity acceleration constant and  $T/U$  is the ratio between the arms of the Valley lever (Figure 2).

The average normal stress  $\tau_n$  ( $N/m^2$ ) in the gap is given by the formula:

$$\tau_n = \frac{F_n}{A_c} \quad (\text{Equation 2})$$

in which  $A_c$  ( $m^2$ ) is the contact area between the rotor and the stator in  $m^2$ .

The calculation of the average tangential force resorts to the formula of the work of a tangential force on a rotating cylinder:

$$dW = F_t * ds = F_t * r * d\alpha \quad (\text{Equation 3})$$

in which  $dW$  (W) is the work developed by the tangential force  $F_t$  (N) as it goes through the distance  $ds$  (m) on the cylinder surface, equivalent to the product of the radius  $r$  (m) of the cylinder by the angle  $d\alpha$  (rad) which was traversed.

For the calculus of the tangential force  $F_t$  (N) the following formula was obtained:

$$F_t = \frac{P_L}{2 * \pi * r * \dot{N}} \quad (\text{Equation 4})$$

in which  $\dot{N}$  ( $s^{-1}$ ) is the speed of rotation and  $r$  (m) is the rotor radius.

The average tangential stress  $\tau_t$  ( $N/m^2$ ) in the gap is calculated with the formula:

$$\tau_t = \frac{F_t}{A_c} \quad (\text{Equation 5})$$

The calculus of viscosity  $\mu$  for a fluid in laminar flow is given by the formula:

$$\tau_t = \mu * \frac{dv}{dz} \quad (\text{Equation 6})$$

in which  $\frac{dv}{dz}$  ( $s^{-1}$ ) is the speed gradient in the fluid, also represented as  $G$ .

Using these formulas for the case of a non-newtonian fluid (the pulp suspension), one can relate the average tangential stress  $\tau_t$  ( $N/m^2$ ) and the apparent viscosity  $\mu_{ap}$  ( $Pa.s$ ) in the gap  $e$  ( $m$ ) of the Valley by the formula:

$$\tau_t = \mu_{ap} * \frac{\Delta v_e}{e} \quad (\text{Equation 7})$$

in which  $\Delta v_e$  ( $ms^{-1}$ ) is the speed differential between rotor bar surface and the stator bar surface.

Finally, one may calculate the pulp suspension apparent viscosity as beating evolves through the formula:

$$\mu_{ap} = \frac{\tau_t}{\left(\frac{\Delta v_e}{e}\right)} = \frac{\tau_t}{\left(\frac{2\pi \cdot \dot{N} \cdot r}{e}\right)} = \frac{\tau_t}{G} \quad (\text{Equation 8})$$

To test the underlying hypotheses of a laminar flow, the Reynolds was evaluated as being lower than 14, which confirms its validity.

## RESULTS

In figure 4 it is represented the relationship between apparent viscosity and the shear rate in the gap clearance for all the refining essays carried out at a consistency of 1.56%, with all different fibres. It can be seen that the apparent viscosity  $\mu_{ap}$  decreases with the increase of the shear rate. So, the pulp suspension can be considered as a pseudoplastic non-newtonian fluid. Many different mathematical models were proposed by different researchers to describe the rheological behaviour of pseudoplastic fluids. Amongst them we can refer those of Prandlt-Eyring, Ellis, Reiner-Philippoff, Sisko, Cross, Meter e Herschel-Bulkley (Kao, 1983). Anyhow, the equation which best describes most of the pseudoplastic fluids is the power law of Ostwald – de Waale:

$$\mu_{ap} = K.G^{n-1} \quad (\text{Equation 9})$$

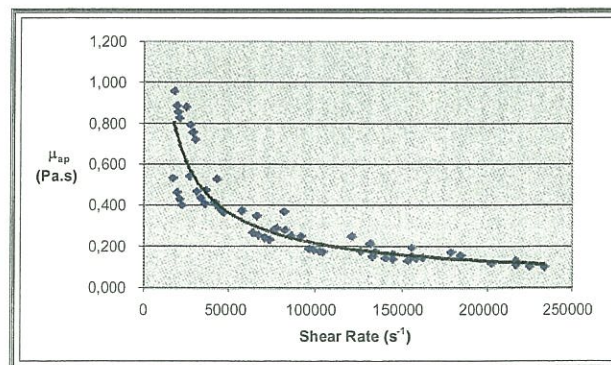


Fig. 4 Pulp apparent viscosity ( $Pa.s$ ) versus shear rate ( $s^{-1}$ ) in the gap clearance.

Kao (1983) refers essays with a 4% pulp suspension presenting a value of  $n = 0.58$ . Radoslavova (1996) obtained values for  $n$  between 0.51 and 0.66. Norman et al (1978) present a value of  $n = 0.333$ , which is close to the results obtained in this work.

The influence of fibre morphological characteristics on the apparent viscosity obeys the Batchelor law:

$$\ln\left(\frac{\mu_{ap}}{\mu_{Water}}\right) = n_1 + n_2 \cdot \ln\left(\frac{L}{D}\right) \quad (\text{Equation 10})$$

As the different pulps used in the present experimental work exhibit similar aspect ratio  $L/D$  ( $L$  is the fibre average length and  $D$  is the fibre average diameter), the main effect on the apparent viscosity is the shear rate.

The results also show that different pulps reveal different rheological behaviour, namely apparent viscosity, for the same operating conditions of the Valley laboratory beater (speed of rotation and charge on the rotor), which highlights the different response of the various pulp suspensions to the beater variables.

## CONCLUSIONS

The pulp suspensions present rheofluidificant behaviour. For a given pulp suspension the apparent viscosity diminishes with the beating time, as a result of the reduction in the gap clearance due to the increased fibre flexibility and shortening. The different rheological behaviour under the same operating conditions for different pulps leads to the inference that from the hydrodynamical point of view one should treat pulps with different morphological characteristics separately.

## REFERENCES

- Ebeling, K. - A Critical Review of Current Theories for the Refining of Chemical Pulps. International Symposium on Fundamental Concepts of Refining, Appleton: 1980, p. 1- 36.
- Espírito Santo, A. – Instrumentação Digital para Medida e Processamento de Grandezas Eléctricas. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, 2001.
- Kao, D.T.Y. – Rheology of Suspensions. Chapter 33. In CHERMISINOFF, N.P.; GUPTA, R: - Handbook of Fluids in Motion. Ann Arbor Science, p. 863-893. 1983. ISBN 0-250-40458-3.
- Lumiainen, J. – Refining of Chemical Pulps. IN PAULAPURO, H. (EDITOR) – Papermaking Part 1, Stock Preparation and Wet End (Chapter 4). Papermaking Science and Technology (Book 8), Fapet Oy, Helsinki, 2000, p. 87-122. ISBN 952-5216-00-4.
- Norman, B.; Moller, G. K.; Ek, R.; Duffy, G. G. - Hydrodynamics Of Papermaking Fibres In Water Suspension. Symposium on Fibre –Water Interactions in Papermaking, Oxford. Vol. I. ISBN 0-900219-04-1.1978, p. 195-249.
- Radoslavova, D. – Modélisation Hydrodynamique du processus de Raffinage des Pâtes a Papier. Doctoral Thesis. Institut National Polytechnique de Grenoble. 1996, p. 67-93.
- Vaz, A. – The Refinability of Paper Chemical Pulps: a contribution for its evaluation using the Valley beater. Doctoral Thesis. Universidade da Beira Interior. 2005, p. 75-97.

A0723.0048	Evaluation of Spur Gear Root Stress for Thin Rimmed Gear, by <i>Sorin Cananau, and Thami Zeghloul</i>	297
A0724.0713	Influence of Friction on Gear Dynamics, by <i>Paulo B. Fernandes, José Dias Rodrigues, Jorge Seabra, and Joaquim S. Domingues</i>	299
A0725.0732	The States of Oil Film Formation and Ball Motion in Ball Screw with Retainers, by <i>Akira Nakajima, and Toshifumi Mawatari</i>	301
A0726.0718	Measurement of Film Thickness and Pressure Distribution in Rough EHL Contacts, by <i>B.R. Höhn, K. Michaelis, and O. Kreil</i>	303
A0727.0710	Non-Newtonian and Thermal EHD Analysis of a Transmission Gear Oil (SAE 80W90), by <i>Armando Campos, Alexandre Sottomayor, and Jorge Seabra</i>	305
A0728.0728	Influence of Grease Composition on Rolling Contact Wear (RCW), by <i>Vitor Mota, and Luís A. Ferreira</i>	307
A0729.0716	Some Aspects of Oil Lubricant Additivation with ZnO Nanoparticles, by <i>Antolin Hernández, J.E. Fernández Rico, Ricardo Tucho, J. Manuel Cuevas, and Rogelio Chou</i>	309
A0730.0724	Analysis and Discussion of Models for Non Conformal Contacting Cylinders, by <i>Cândida Pereira, Amílcar Ramalho, and Jorge Ambrósio</i>	311
A0731.0037	A Three-Field Nonconforming Multidomains Strategy for Contact Problems, by <i>José A. Rodrigues</i>	313
A0732.0730	Modelling and Simulation of Wear in Mechanical Systems, by <i>Paulo Flores, J.C. Pimenta Claro, Jorge Ambrósio, and Hamid M. Lankarani</i>	315
A0733.001	How the Releasing Moment of Conical Steel Couplings is Influenced by the Combined Effect of Adhesive and Interference, by <i>Dario Croccolo, and Rossano Cuppini</i>	317
A0734.0719	Efficiency of Door and Seat Cables: Influence of Materials and Operating Conditions, by <i>José Mendes, Pedro Lopes, Luís Magalhães, and Jorge Seabra</i>	319
A0735.0708	Thermal Behaviour and Performance Characteristics of a Twin Axial Groove Journal Bearing as a Function of Applied Load and Rotational Speed, by <i>F.P. Brito, J. Bouyer, M. Fillon, and A.S. Miranda</i>	321
A0736.0076	An Improved Method for the Numerical Integration of the Dynamic Equilibrium Equation of a Squeeze Film Air Bearing Supported Member, by <i>Eduardo M. Almas, F. Pina da Silva, and Nuno M. Maia</i>	323
A0737.0703	Experimental Analysis on Hydrostatic Compensation in Spherical Bearings, by <i>Nicola Belfiore, F. Ianniello, F. Moretti, M. Presta, M. Scaccia, and L. Consorti</i>	325
A0738.0725	Behavior of Mineral Base Oils with PTFE Nanoparticles, by <i>J.E. Fernández Rico, J. Minondo, R. Tucho, and D. Garcia Cuervo</i>	327
A0739.0045	The Effect of Shear Rate on Apparent Viscosity for Different Pulp Suspensions, by <i>Álvaro Vaz, R. Simões, and J. Silva</i>	329
A0740.0731	From a Roller Bearing Concept to a Snow Avalanche Protection Cell, by <i>Fernando Pina da Silva</i>	331
A0741.0720	Analytical Techniques to Control Used Biodegradable Lubricants, by <i>A. Marcaide, A. Arnaiz, J. Barriga, E. Aranzabe, A. Igarua, and H. Bock</i>	333
A0742.0715	Analysis of Lubricating Greases by Ferrography, by <i>Beatriz Graça, Armando Campos, and Jorge Seabra</i>	335
A0743.0729	Condition Monitoring of Biodegradable Oils and Greases for Lubricated Machinery Maintenance, by <i>Aitor Arnaiz, Eneko Gorritxategi, Eduardo Gilbert, Mike Burrows, and Tom Clayton</i>	337
A0744.0053	Wear Resistance of Different Matrixes Used for Abrasives, by <i>J. Abenojar, R. Calabrás, S. Guzmán, F. Velasco, M.A. Martínez, and M. Mendoza</i>	339

## *Anexo IX*

---

P. Baptista, C. Gil, M.E. Amaral, F. Domingues, A.P. Duarte (2008). Influence of extraction conditions on flavonoid yields from different Portuguese forest residues, Proceedings of chempor 2008 - 10th International Chemical and Biological Engineering Conference, ISBN:978-972-97810-4-9862-863, 4-6 setembro 2008, Universidade do Minho, Portugal

## Influence of extraction conditions on flavonoid yields from different Portuguese forest residues

Patrícia Baptista<sup>1</sup>, Cristina Gil<sup>2</sup>, M. Emilia Amaral<sup>2</sup>, Fernanda Domingues<sup>2</sup>,  
Ana Paula Duarte<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Paper Science and Technology, University of Beira Interior, 6201-001  
Covilhã, Portugal

<sup>2</sup>Research Unit of Textile & Paper Materials, University of Beira Interior, 62001-001  
Covilhã, Portugal

**Keywords:** Flavonoids, Solvent extraction, Forestry residues; Shrubs, Maritime pine

### Introduction

The Portugal forest area represents around 38% of the territory, which could represent a large quantity of forestry residues (pruning) and shrub species that can be used as raw material for biofuel production, like bioethanol. This subject is currently under investigation in our R&D Unit and attending to the biorefinery concept all the plants used in the project will be investigated for biologically active products. Among the bioactive compounds present in plants, polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant and anticarcinogenic activities (Ren et al., 2003). The present work is a preliminary study about the characterization of solvent extracts of some plant species studied in this project, namely *Pterospartum tridentatum* (known as *carqueja* in Portugal), *Cistus ladanifer* (rock-rose), *Arbutus unedo* (strawberry tree) and a wood species, *Pinus pinaster* (maritime pine). So, a study of the influence of some critical extraction variables (type of solvent, time of contact, solvent renovation and solid/liquid ratio) on the total and flavonoids yield of resultant extracts was carried out.

### Material and Methods

The arbustive species and pine residues were collected in May 2007 and stored at room temperature during six months. All plants consisted of wood/stalks, bark and leaves and were milled in a Retsch cutting mill to a particle size between 0,180 mm and 0,500 mm. The solvent extractions were carried out by maceration using methanol and ethanol 95% as solvents. Time contact and solid/liquid ratios were varied and the influence of solvent renovation was observed according to the following schema:

Ethanol maceration	$\left\{ \begin{array}{l} 1/10 \\ 5 \times 4h \\ 1/20 \\ 1/50 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1/10 \\ 2 \times 10h \\ 1/20 \\ 1/50 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1/10 \\ 20h \\ 1/20 \\ 1/50 \end{array} \right.$	Methanol maceration	$\left\{ \begin{array}{l} 1/10 \\ 2 \times 24h \\ 1/20 \\ 1/50 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1/10 \\ 1 \times 48h \\ 1/20 \\ 1/50 \end{array} \right.$
--------------------	--	---	--	---------------------	---	---

Methanol was also used for an extraction with Soxhlet apparatus until the solvent became colourless. Flavonoids were determined by aluminium chloride colorimetric method using quercetin for the preparation of calibration curve (Pourmorad et al., 2006). All determinations were carried out in duplicate.

### Results and Discussion

All the studied lignocellulosic materials were found to be important sources of flavonoids, although the efficiency of the extraction varied with experimental conditions and plant species (Fig. 1 and 2). Among the two solvents used (ethanol and methanol), methanol was the most favourable for total extractables, but by using longer extraction times. For extracting flavonoids, the selectivity of both solvents was dependent on the plant species.

For some species, the flavonoids extraction was highly influenced by solvent renovation (e.g. *A. unedo*), while some others were negatively affected (*P. pinaster*).

\* Corresponding author. Tel + 351-275-319792. E-mail: apduarte@ubi.pt

The 1/10 ratio was found to give the best results for the flavonoids ethanol extraction from *A. unedo*, while from *P. pinaster* the ratio was 1/50. The extraction of flavonoids from *C. ladanifer* seemed to be the lesser influenced by the extraction conditions and solvent used.

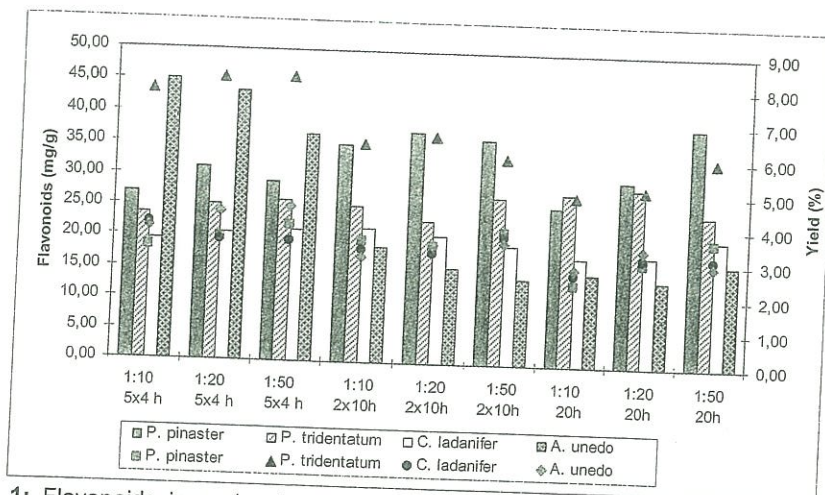


Fig. 1: Flavonoids in mg/g of oven dry material (columns) and total extract yields (markers) of plant extracts for different extraction conditions with ethanol 95%.

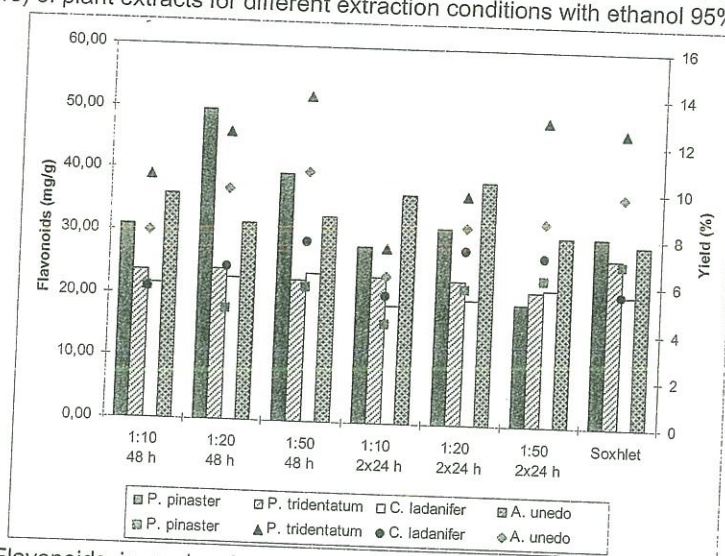


Fig. 2: Flavonoids in mg/g of oven dry material (columns) and total extract yields (markers) of plant extracts for different extraction conditions with methanol.

**References**

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J. Biotechnology*, 5, 1142-1145.  
 Ren, W., Zhenhua, Q., Hongwei, W., Zhu, L., Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23, 519-534.

## *Anexo X*

---

C. Gil, M. E Amaral, M. Tavares, R. Simões (1999). Estudo do potencial papelheiro da acácia spp., 1º Encontro sobre Invasoras Lenhosas, 171-178, 16-18 novembro 1999, Gerês, Portugal.

## COMISSÃO CIENTÍFICA

**Ángelo Oliveira**  
Instituto Superior de Agronomia

**Fernando Páscoa**  
Escola Superior Agrária de Coimbra

**Francisco Javier Silva Pando**  
Consellería de Medio Ambiente-Xunta de Galicia

**Francisco Rego**  
Estação Florestal Nacional

**João Varela**  
Direcção Regional de Agricultura do Algarve

**Jorge Paiva**  
Universidade de Coimbra

**José Alves Ribeiro**  
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**José Neiva Vieira**  
Direcção Geral das Florestas

**Maria Helena Ramos Lopes**  
Instituto de Conservação da Natureza

**Mário Tavares**  
Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais

## COMISSÃO ORGANIZADORA

**Daniel Manso Fernandez**  
Parque Natural Baixa Limia - Serra do Xurés

**Idalina Andrade Leite**  
ADERE - Peneda Gerês

**Isabel Moreira da Silva**  
Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho

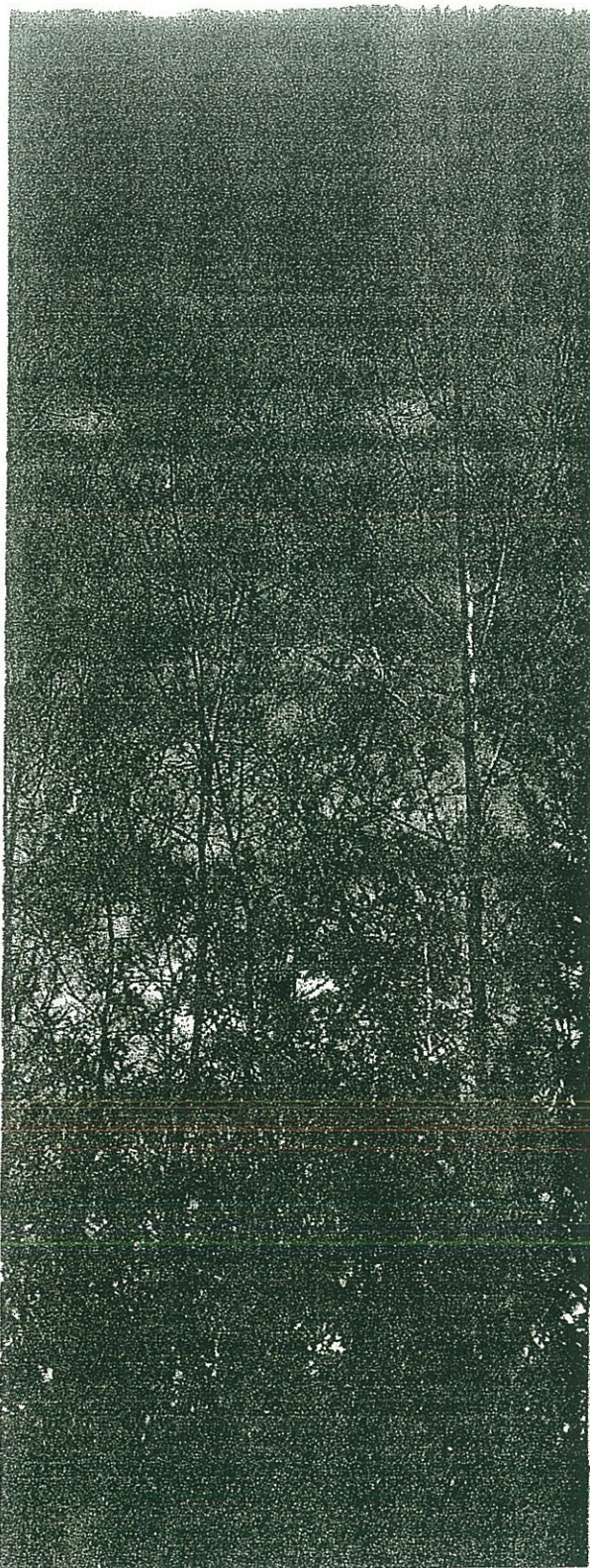
**José Marcos Liberal**  
Parque Nacional da Peneda Gerês

**Manuel Miranda Fernandes**  
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Maria Eugénia Rocha**  
Estação Florestal Nacional

**Mário Tavares**  
Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais

**1.º Encontro Invasoras Lenhosas**  
16 a 18 de Novembro de 1999 GERÊS - AUDITÓRIO DO CENTRO DE ANIMAÇÃO TERMAL



# Estudo do Potencial Papeleiro da Acácia

Cristina Gil, M<sup>a</sup> Emília Amaral, Mário Tavares, Rogério Simões

Universidade da Beira Interior  
Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel  
6200 – Covilhã - Portugal

## Resumo

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a aptidão papeleira de diferentes espécies de acácias existentes em Portugal. A matéria prima foi caracterizada em termos processuais, biométricos e de aptidão papeleira. No que respeita à transformação em pasta para papel, estas amostram apresentam comportamentos comparáveis ao eucalipto, ainda que diferenciados entre si. Posteriormente, analisou-se o potencial papeleiro destas matérias primas, tomando como referência o *E. globulus*, tendo-se verificado que, apesar do bom desempenho destas pastas, o *E. globulus* continua a ser o mais adequado para a produção de papel de impressão e escrita.

## Abstract:

The present paper reports data about paper ability of different Acacia wood species existing in Portugal. The raw material was characterized in order to processual, biometric and paper aptitude. Concerning the pulps, they present a similar behaviour to Eucalyptus, although we can identify differences between them.

Subsequently, the paper potential of these raw materials was analysed, taking *Eucalyptus globulus* pulp as a reference. The results show us that *Eucalyptus globulus* still is the raw material more suitable for printing and writing papers, in spite of the good performance of the Acacia wood pulps.

**Palavras chave:** *Acacia melanoxylon*, *Acacia dealbata*, *Acacia longifolia*, *Eucalyptus globulus*, Pasta, Potencial papeleiro

## 1 - Introdução

No mercado mundial de fibra curta, a pasta branqueada de *Eucalyptus globulus* ocupa um lugar de destaque, sendo os papéis de impressão e escrita a sua principal utilização. Porém, a posição do *Eucalyptus globulus* no mercado destas fibras poderá vir a ser ameaçada pela pasta de *Acácia s.p.p.* proveniente de países asiáticos. O crescente número de plantações com fins industriais, as boas condições ecológicas destas regiões (1,2) e a qualidade da fibra (3) são trunfos a considerar.

Em Portugal foram introduzidas algumas espécies de Acácias (nomeadamente as *Acacias melanoxylon*, *dealbata*, *cynophylla* e *longifolia*) oriundas principalmente da Austrália e dada a sua importância económica e a sua dispersão pelo país (4) merecem actualmente a nossa atenção.

O objectivo principal deste trabalho é efectuar um estudo comparativo da aptidão papeleira da madeira de *Acacia melanoxylon*, *dealbata* e *longifolia*, relativamente à de *Eucalyptus globulus* tomada como referência.

## 2 - Parte Experimental

As três espécies de acácias foram fornecidas sob a forma de rolaria pela Estação Florestal Nacional e o *Eucalyptus globulus* é um clone do programa de melhoramento florestal da Portucel, fornecido sob a forma de aparas. A tabela 1 apresenta informação relativa à origem da matéria prima e outros aspectos afins.

Tabela 1 – Dados relativos às matérias primas utilizadas neste estudo.

Material	Origem	Idade, anos	D <sub>ap</sub> , Cm	Designação
<i>Acacia melanoxylon</i>	Mata Nacional do Camarido	22	14,1	M4 (4 – n° de árvore)
<i>Acacia longifolia</i>	Dunas de Mira	12	15,5	L2 (2 – n° de árvore)
<i>Acacia longifolia</i>	Dunas de Mira	14	10,6	L3 (3 – n° de árvore)
<i>Acacia dealbata</i>	Dunas de Mira	18	16,8	D3 (3 – n° de árvore)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Zona de Aveiro	8	-	EUC

Depois de destrocados os rolos, procedeu-se à classificação das aparas recuperando para os trabalhos posteriores as aparas com espessuras inferiores a 10 mm. Na fracção seleccionada determinou-se para algumas aparas a densidade básica segundo o procedimento clássico, para outras realizou-se a transformação destas em pasta, utilizando o processo kraft num digestor descontínuo, de acordo com as condições operatórias apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Condições de cozimento.

Massa de material utilizado	1000 g o.d.
Carga de Alkali Activo (NaOH), %	22,7
Carga de Alkali Efectivo (NaOH), %	20,1
Índice de Sulfidez, %	23
Relação líquido : madeira	4:1
Tempo até T <sub>max</sub>	2h
T <sub>max</sub>	170°C
Tempo à T <sub>max</sub>	1 h:10 min
Factor H	605—610

No final do cozimento recolheu-se licor para análise e o material sólido obtido foi lavado e crivado, obtendo-se a pasta e alguns incozidos. Através da análise do licor determinou-se o consumo de reagentes e caracterizou-se o processo de transformação e a qualidade da pasta obtida, de acordo com os procedimentos “standard” (5).

Posteriormente, a pasta foi caracterizada em termos da distribuição de comprimentos dos elementos fibrosos e da sua massa linear média, usando para o efeito o equipamento “Fiber Quality Analyser”.

Para avaliar o potencial papeleiro das pastas seguiram-se os procedimentos clássicos, que envolvem os seguintes passos: refinação das pastas no PFI a diferentes rotações (ISO 52 64/2-

79), formação de folhas de papel laboratoriais (SCAN-C 26:76 e SCAN-M 5:76) e caracterização físico-mecânica e óptico-estrutural das folhas de papel segundo as normas “standard” usadas para as diferentes propriedades apresentadas, depois das folhas serem condicionadas numa atmosfera de  $50 \pm 2$  %HR e  $23 \pm 1$  °C.

### 3 - Resultados e Discussão

Este estudo inclui os seguintes aspectos: (i) o comportamento das matérias primas no processo de transformação em pasta para papel; (ii) a análise das características biométricas das pastas correspondentes; (iii) a análise do potencial papeleiro.

Antes de submeter as matérias primas ao processo de transformação em pasta, determinou-se a densidade básica da madeira, tendo-se obtido os resultados da tabela 3.

Tabela 3. Densidade básica das matérias primas ensaiadas.

Madeira	M4	L2	L3	D3	EUC
Densidade Básica, $\text{kg.m}^{-3}$	460	460	440	490	460

Os valores obtidos para as diferentes matérias primas são bastante semelhantes. No entanto é de salientar que o *Eucalyptus globulus* aqui utilizado apresente uma densidade básica relativamente baixa, já que o mais comum são valores superiores a  $500 \text{ kg.m}^{-3}$ . Outro aspecto a referir é o valor obtido neste trabalho para a M4, que é inferior ao reportado por Furtado (6) que cita um valor de  $520 \text{ kg.m}^{-3}$  para a mesma espécie, proveniente de outra região do País e eventualmente com outra idade. Este facto é perfeitamente natural, mas pode ter implicações nas características do material fibroso e no correspondente desempenho papeleiro.

#### 3.1 - Transformação da madeira em pasta

Para avaliar o comportamento das diferentes matérias primas no processo de transformação em pasta, submeteram-se todas as amostras às mesmas condições de reacção (ver tabela 2), encontrando-se os resultados obtidos na tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização do processo de cozimento e das pastas obtidas.

	M4	L2	L3	D3	EUC
[AE] residual, g/l (NaOH)	13,8	14,6	18,1	9,54	12,1
Consumo de AE, %	14,56	14,24	12,87	16,28	15,28
Rendimento em pasta, %	55,7	52,2	47,6	51,1	52,5
Incozidos, %	4,46	1,37	3,47	2,59	0,09
Índice kappa	11,0	13,3	16,2	13,4	12,2
Viscosidade, $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$	1089	1144	1195	1131	1100

Analisando a tabela podemos dizer que as matérias primas apresentam comportamentos significativamente diferentes. Na discussão dos resultados o *E. globulus* é a nossa amostra de referência. Assim, no que diz respeito à produção de pasta, a matéria prima mais rentável seria a M4, já que apresenta um rendimento em pasta significativamente superior ao eucalipto,

a pasta crua tem menor teor de lenhina residual e o consumo de reagentes é muito aceitável e inferior ao verificado para o eucalipto. De notar que a L3 apresenta um consumo e um rendimento em pasta anormalmente baixos, mas a extensão da deslenhificação foi inferior às restantes, o que deverá ser objecto de novos ensaios.

### 3.2 - Caracterização do material fibroso

Nas pastas obtidas determinou-se a distribuição de comprimentos dos elementos fibrosos e a correspondente massa linear média. A tabela 5 apresenta os valores médios para a pasta antes da refinação - 0 rotações PFI - e após a refinação – para 4000 rotações PFI. No que respeita ao comprimento médio, o EUC apresenta as fibras mais compridas, embora a M4 apresente valores muito próximos. Por outro lado, o eucalipto utilizado nestes ensaios apresenta a menor massa linear de entre as 5 matérias primas ensaiadas, o que constitui um resultado diferente do obtido por Furtado (6), utilizando o mesmo método de medida. Esta aparente contradição pode ser atribuída à origem da matéria prima.

Tabela 5 – Características biométricas das pastas.

	0 rotações PFI		4000 rotações PFI	
	Comprimento médio das fibras (mm)	Massa Linear (mg/m)	Comprimento médio das fibras (mm)	Massa Linear (mg/m)
M4	0,75	6,1	0,71	5,9
L2	0,63	6,6	0,62	7,9
L3	0,72	6,2	0,70	7,8
D3	0,66	7,6	0,61	7,1
EUC	0,80	5,5	0,74	5,8

### 3.3 - Análise do potencial papelero das pastas

Para analisar a aptidão papelero de uma pasta é necessário submetê-la a um tratamento mecânico na presença de água, denominado refinação, que tem por objectivo desenvolver a capacidade de ligação entre as fibras e assim permitir revelar a aptidão das pastas para o fabrico de papel. Neste sentido, cada pasta foi submetida no refinador PFI a dois níveis de refinação (2000 e 4000 rotações PFI), tendo-se produzido para cada pasta três conjuntos de folhas de papel standard (0, 2000 e 4000 rotações PFI). As folhas foram posteriormente analisadas em termos das suas características óptico-estruturais e físico-mecânicas. Os resultados obtidos constam da tabela 6.

Na figura 1 representa-se a evolução da drenagem (uma propriedade da suspensão fibrosa), medida pelo grau Schopper-Riegler, °SR, em função do nível de refinação, para as diferentes matérias primas. É notório que o EUC e a M4 apresentam comportamentos semelhantes entre si e bastante díspares das restantes matérias primas. Como os resultados da tabela 5 parecem indicar que as diferenças não são, no essencial, devidas à produção de elementos finos no processo de refinação, já que o índice de corte é semelhante para os diferentes materiais, somos levados a concluir que as diferenças residem na natureza das fibras.

Tabela 6 – Potencial papeleiro das diferentes pastas.

AMOSTRAS	M4			L2			L3			D3			EUC		
Nº rotações	0	2000	4000	0	2000	4000	0	2000	4000	0	2000	4000	0	2000	4000
°SR	15	28	38	14	39	55	16	37	58	14	35	57	17	29	39
G, g.m <sup>-2</sup>	59,5	60,4	59,7	61,9	59,7	60,3	60,3	60,4	64,3	59,0	60,5	60,8	59,8	59,7	58,7
M. V., g.cm <sup>-3</sup>	0,47	0,71	0,75	0,56	0,79	0,83	0,60	0,79	0,88	0,46	0,74	0,80	0,43	0,66	0,75
Lisura, seg Bekk	8	77	130	17	141	198	26	159	260	7	100	202	3	50	133
Perm ao ar, um.(Pas) <sup>-1</sup>	25	10	2,8	21	2,9	0,31	29	1,6	0,21	26	3,8	0,41	27	13	2,4
I. Reb, kPam <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	0,741	4,82	5,75	0,851	4,45	5,80	1,32	6,52	7,12	0,285	3,68	5,35	0,937	4,70	6,85
I. Rasg., mNm <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>	3,36	8,11	9,78	2,58	7,64	9,14	3,71	8,61	8,96	1,36	6,17	8,16	3,34	8,93	10,77
Alongto,%	0,7	3,5	4,2	0,9	4,0	4,6	1,1	3,5	4,2	0,4	3,1	3,8	0,8	3,4	3,9
I.Tracção, Nm.g <sup>-1</sup>	22,6	78,07	94,0	25,1	77,5	89,1	35,6	84,6	114,4	12,8	76,68	90,54	30,3	85,9	107,7
C. Interna, J.m <sup>-2</sup>	41	189	323	38	296	458	46	285	471	27	291	478	42	261	414
Opacidade,%	97,71	95,28	94,08	98,13	94,48	92,39	98,27	96,13	94,27	97,24	94,94	92,33	97,34	94,83	92,56
Brancura ISO	44,99	39,45	37,38	41,34	34,14	31,48	37,74	31,13	27,98	39,89	33,44	30,5	48,9	42,72	39,1
k', m <sup>2</sup> .kg <sup>-1</sup>	7,83	7,24	7,16	8,97	8,22	7,76	10,73	10,25	9,23	8,72	8,07	7,79	6,51	6,4	6,33
s', m <sup>2</sup> .kg <sup>-1</sup>	48,1	32,3	28,5	44,0	26,3	21,3	40,7	26,2	19,3	40,0	25,9	20,7	51,2	34,6	27,6

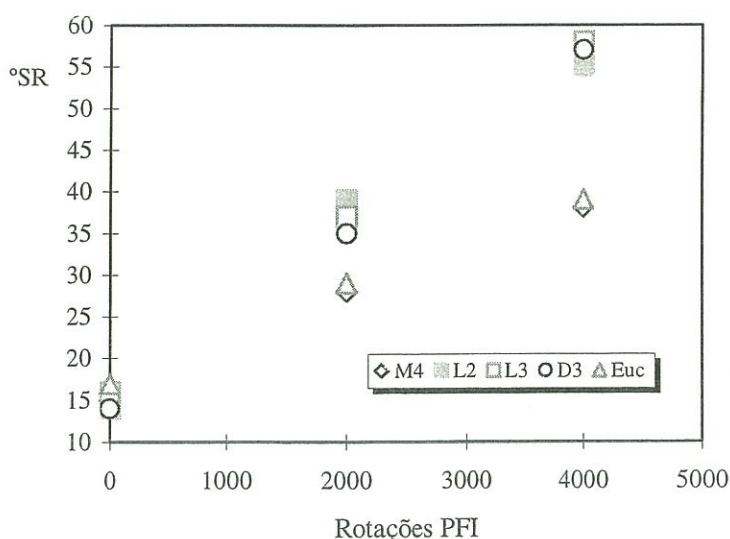


Figura 1 – Grau Schopper-Riegler em função do nível de refinação.

Na figura 2 está representada a densidade da folha de papel em função da refinação, tornando-se evidente de novo que as folhas de EUC e de M4 são semelhantes entre si e bastante diferentes das restantes. O papel da M4 e do EUC é menos denso do que o das restantes

matérias primas. Estes resultados são também perfeitamente consistentes com o coeficiente específico de difusão de luz ( $s'$ ), uma propriedade determinante em muitas aplicações, tais como papéis de impressão e escrita. De facto,  $s'$  é superior para o *E. globulus* e para a *Acacia melanoxylon*. A permeabilidade ao ar é naturalmente superior para o material menos denso.

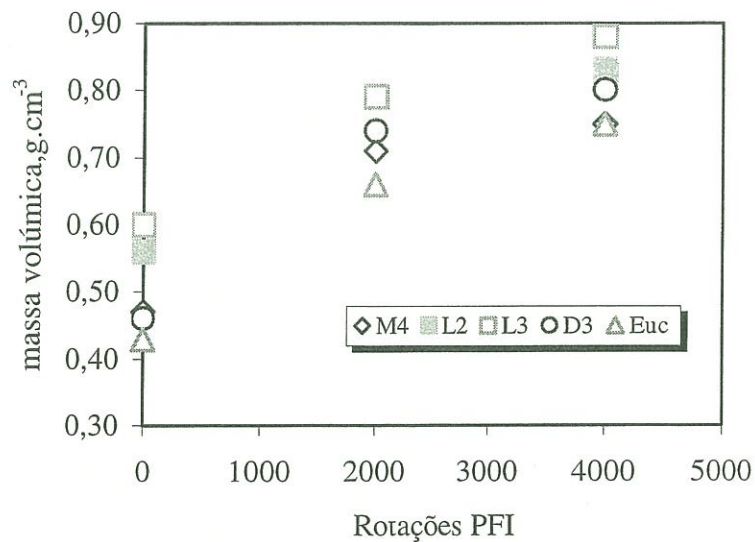


Figura 2 – Massa volúmica das folhas de papel em função do nível de refinação.

Na figura 3 representa-se a coesão interna em função do nível de refinação. As folhas obtidas a partir da pasta M4 são aquelas que exibem menor coesão interna, apresentando as restantes níveis superiores e comparáveis. A baixa capacidade de ligação entre fibras evidenciada pela pasta M4, apesar do razoável comprimento das fibras, faz com que apresente valores relativamente baixos para as resistências à tracção e ao rebentamento.

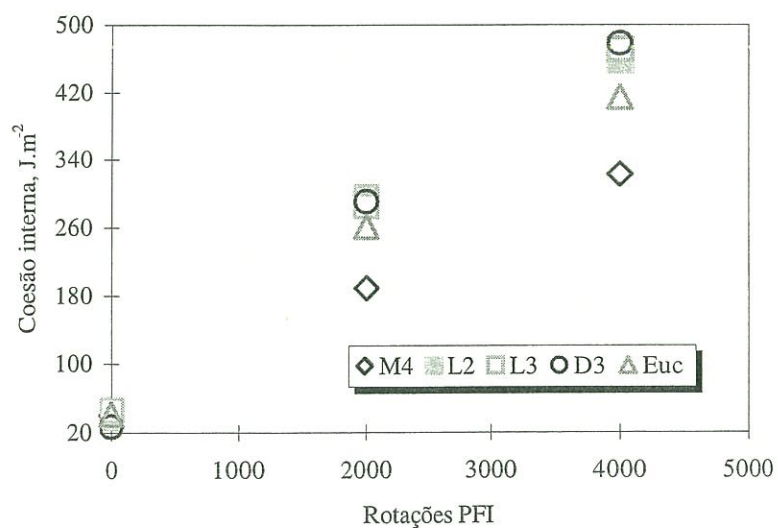


Figura 3 – Coesão interna em função do nível de refinação.

Por outro lado, o EUC apresenta níveis de coesão interna intermédios e exibe muito boas resistências físico-mecânicas. As folhas da pasta L3 apresenta resistências ligeiramente

superiores, mas à custa da maior massa volúmica das folhas de papel, o que pode não ser muito bom para papéis de impressão e escrita já neste caso, a opacidade dos papéis brancos iria ser baixa.

Na figura 4 representa-se o índice de tracção em função da massa volúmica das folhas de papel, donde se pode ver que para a mesma massa volúmica, o eucalipto exhibe valores de índice de tracção superiores; o mesmo se verifica para o índice de rasgamento.

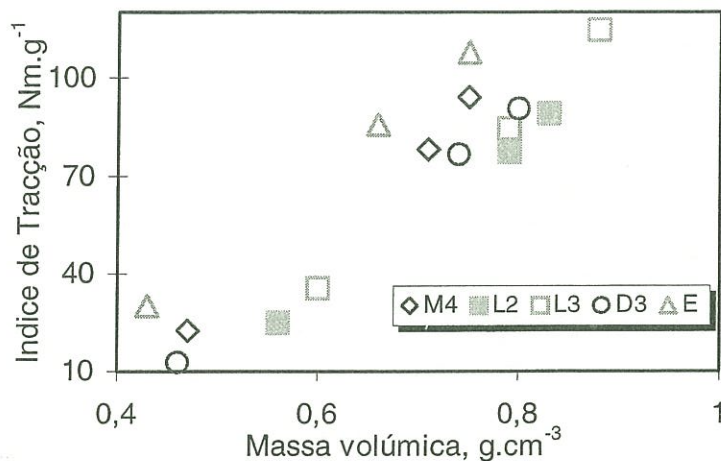


Figura 4 – Índice de tracção *versus* massa volúmica do papel, para as diferentes matérias primas.

A representação do índice de tracção em função do coeficiente de difusão de luz (figura 5) mostra claramente que para aplicações em papéis de impressão e escrita, onde esta propriedade é determinante, o papel fabricado a partir do eucalipto é o mais adequado.

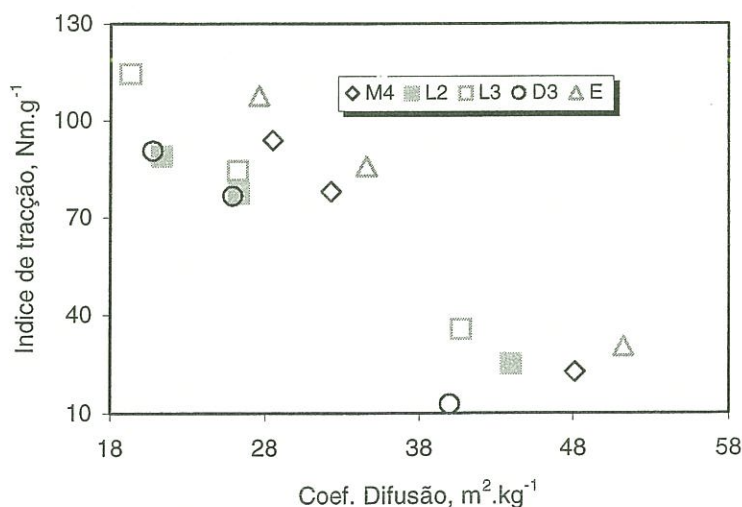


Figura 5 – Índice de tracção em função do coeficiente específico de difusão de luz (s'), para as diferentes matérias primas.

## 4 - Conclusões

As madeiras das diferentes espécies de Acácias utilizadas neste estudo apresentam uma boa aptidão para o processo de transformação em pasta, apesar de algumas delas terem idades elevadas. O consumo de reagentes no cozimento e o grau de deslenhificação atingido compara favoravelmente com o *E. globulus*.

O comprimento médio das fibras é ligeiramente inferior ao apresentado pelo *E. globulus* e as massas lineares são comparáveis.

No que diz respeito ao potencial papelero, existem diferenças significativas entre os diferentes materiais fibrosos analisados. Enquanto a *Acacia melanoxylon* ensaiada se aproxima do *E. globulus* do ponto de vista da estrutura do papel, as restantes dão origem a papéis mais densos e, conseqüentemente, menos porosos, menos permeáveis e com menor coeficiente específico de difusão de luz. Em contrapartida estes últimos papéis apresentam maior resistência aos esforços de tracção e de rebentamento. Porém, para aplicações em papéis de impressão e escrita, onde se exige resistência mas também opacidade, o *E. globulus* é o melhor posicionado.

## 5 - Bibliografia

- (1) Balodis, V., Clark, N.B., "Tropical acacias – the new pulpwood", *Appita*, **51** (5): 179 (1998).
- (2) Matheson, A.C., Harwood, C.E.; Michell, A.J., "Tropical Australian Acacias", *Appita*, **51** (7): 261 (1998).
- (3) Paavilainen, L., "Quality – Competitiveness of asian short-fibre raw materials in different paper grades", *Know-how Wire Laako Poyry Magazine* 1/98, p. 4-8.
- (4) Góis, E., "A floresta portuguesa: sua importância e descrição das espécies de maior interesse", Publicações Portucel, 1991.
- (5) Santos, I., Gaiolas, C., Curto, J., Silvy, J., Santos Silva, M., Simões, R., "Estudo comparativo do potencial papelero das pastas kraft de *Pinus oinaster* e de *Pinus sylvestris*", *Tecnicel* 1998, Covilhã.
- (6) Furtado, F.P., "Caracterização de acácias e estudo da sua incorporação na produção de pasta", Relatório Interno, R-TEC-43/94, Tecnocel, Eixo, 1994.

## *Anexo XI*

---

S. Fernandes, C. Gil, A.P. Duarte (2005). Influência da concentração de PCC, do pH e da Temperatura na Colagem Interna com ASA em pastas de Eucalyptus globulus ENGENHARIA'2005 - Inovação e Desenvolvimento, 6 p. em CD-ROM, 21-23 novembro 2005, Covilhã, Portugal.

# Influência da concentração de PCC, do pH e da Temperatura na Colagem Interna com ASA em pastas de *Eucalyptus globulus*

Susana Fernandes<sup>1</sup>, Cristina Gil<sup>1,2</sup> e Ana Paula Duarte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros, Universidade da Beira Interior, 6200 Covilhã

<sup>2</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel, Universidade da Beira Interior, 6200 Covilhã

Telf: +351 275 319792; fax: +351 275 319740; e-mail: [s\\_nedio@hotmail.com](mailto:s_nedio@hotmail.com);

[cristina.gil@ubi.pt](mailto:cristina.gil@ubi.pt); [apduarte@ubi.pt](mailto:apduarte@ubi.pt)

**Resumo** – Neste trabalho foram compilados os resultados obtidos no estudo do efeito de algumas variáveis, tais como, temperatura, pH, quantidade de carbonato de cálcio precipitado (PCC) e concentração do agente de colagem usado na colagem interna com uma cola celulose-reactiva, o ASA. Utilizaram-se três emulsões de ASA diferentes. Obtiveram-se bons resultados na colagem interna com ASA quando se adicionam níveis de PCC até aproximadamente 30% relativamente à massa seca de fibra. Temperaturas elevadas da suspensão conjuntamente com pH elevado mostram-se prejudiciais à colagem interna com ASA.

## 1. Introdução

O anidrido alcenil succínico (ASA) é um dos agentes sintéticos de colagem interna utilizado nos processos neutro/alcalinos, conhecido pela sua elevada reactividade. Devido a esta propriedade o ASA é fornecido à indústria como um material 100% activo. O ASA é conhecido como sendo uma cola celulose-reactiva muito efectiva, se for aplicado de forma correcta, apenas uma pequena dosagem (normalmente 0,1 - 0,18% dos sólidos da suspensão) é requerida para produzir o grau de colagem desejado<sup>(1)</sup>. Normalmente, esta cola é utilizada em papéis que requerem resistência satisfatória à penetração de soluções aquosas, como os papéis de impressão e escrita<sup>(2)</sup>.

O ASA contém uma cadeia hidrocarbonada hidrofóbica e um grupo altamente reactivo, o grupo anidrido. A estrutura alifática possui normalmente cadeias que podem ir dos (14) – 16 – 18 – (20) átomos de carbono, podendo ser linear ou ramificada e provir de um radical alquílico ou alcénico. Sendo as cadeias ideais as de C-16 e C-18 lineares<sup>(1)</sup>.

O ASA é um agente químico muito reactivo, que reage facilmente com os grupos hidroxílicos da celulose mas, devido à sua alta reactividade, tem estabilidade limitada na presença de água, sendo facilmente hidrolizado. Ambas as velocidades de reacção, quer a esterificação com a celulose quer a hidrólise com a água, são muito rápidas, competitivas e irreversíveis<sup>(3)</sup>.

Devido à insolubilidade e à estabilidade limitada do ASA em água, este tem de ser emulsionado antes da sua adição no ambiente aquoso da máquina de papel, onde deve ser uniformemente disperso. Normalmente são adicionadas pequenas quantidades (3-6% da massa do

ASA) de substâncias tenso-activas e de amido catiónico ou outros polímeros catiónicos sintéticos. Os primeiros, tal como o nome indica, servem para aumentar a actividade da superfície da emulsão, enquanto que, os segundos têm como função estabilizar a emulsão<sup>(4)</sup>. Os factores que influenciam a estabilidade da emulsão são: o pH, a temperatura, a viscosidade do ASA, o tamanho da partícula e o tempo de contacto entre a emulsão e a suspensão fibrosa.

A reacção de desenvolvimento da colagem (formação de ligações éster) na parte húmida da máquina é influenciada por alguns parâmetros tais como: pH, temperatura e alcalinidade, mas também pelo material fibroso e pelas cargas minerais<sup>(5)</sup>.

Entender o processo de colagem interna com anidrido alcenil succínico (ASA) e a química deste agente traz muitos benefícios para o melhoramento do próprio produto e ajuda os papeleiros a compreenderem as vantagens deste aditivo relativamente a outros agentes de colagem interna. Tendo como referência a parca atenção dada a este assunto e os indicadores favoráveis das áreas comerciais das empresas fabricantes de papéis de escritório, papéis estes, que requerem colagem interna com ASA quase que indispensavelmente, verificou-se o interesse do estudo relativamente a esta matéria.

Este estudo foi conduzido em condições laboratoriais num formador de folhas MK com pasta *kraft* branqueada industrial (100% *Eucalyptus globulus*). Foi estudado o efeito de diferentes concentrações de PCC na suspensão fibrosa. Depois de estabelecidas estas condições estudou-se o efeito do pH e da temperatura na colagem com ASA usando duas concentrações diferentes. A eficiência da colagem interna nas folhas de papel elaboradas foi avaliada através da determinação de parâmetros como: o grau Cobb e o ângulo de contacto usando a água como líquido molhante.

## 2. Procedimento experimental

Antes de produzir as folhas laboratoriais para analisar o grau de colagem, foi necessário produzir e analisar a emulsão, laboratorialmente. Foi estudado o efeito das cargas, pela adição de diferentes concentrações de PCC, e também se analisou o efeito do pH e da temperatura da suspensão utilizando-se duas concentrações de ASA.

Na Tabela I são listados os produtos utilizados na produção das emulsões utilizadas neste trabalho.

TABELA I

Características dos materiais utilizados na produção das emulsões

Substância Química	Marca	Designação	Grau de Pureza
Amido massa catiónico	Roquette	HI - CAT 1134 A	≥82%
ASA	Bayer	Baysize I 18 A	90%
ASA	Raisio	Raisafob MF 18 UP	>95%

As emulsões foram preparadas laboratorialmente num misturador (Waring commercial laboratory blender), onde se juntou o amido, o ASA e num dos casos surfactante, numa razão de amido:ASA de 4:1 e a uma temperatura de 30°C. Prepararam-se 3 emulsões diferentes: uma com ASA Padrão (P), uma com ASA Ultra Puro (UP) e uma outra com ASA Ultra Puro conjuntamente com um surfactante (UP+S). O amido utilizado foi cozido laboratorialmente com uma concentração de 3% e com uma temperatura de 90°C com agitação mecânica constante durante 30 minutos (o cozimento do amido decorreu de acordo com a norma TAPPI T 491-94). A percentagem de surfactante adicionada foi de 1% relativamente à quantidade de ASA.

A mistura, ou seja, o processo de emulsificação deu-se durante 1:30 minutos para o caso das emulsões preparadas com ASA UP e UP + S a uma velocidade de 18 000 rpm e durante 3:30 minutos para a emulsão de ASA P sendo neste caso utilizada a velocidade de 22 000 rpm. Na base da optimização da preparação das emulsões esteve presente o tamanho da partícula pretendido - 1µm. O equipamento utilizado na análise da estabilidade do tamanho da partícula foi marca Horiba modelo LA-300.

### B. Preparação das folhas laboratoriais

A matéria-prima utilizada na produção das folhas laboratoriais é listada na Tabela II.

Este trabalho experimental realizou-se utilizando pasta com 100% de fibra de *Eucalyptus globulus*. Para isso estipulou-se um determinado tipo de papel de escritório com um °SR entre 25 e 30, com uma gramagem de 80g/m<sup>2</sup> produzido na indústria com um elevado nível de qualidade, cujo valor objectivo de Cobb<sub>60</sub> para efeitos comerciais é de 28 g/m<sup>2</sup>. O papel foi produzido num processo neutro/alcalino, utilizando como aditivos químicos não fibrosos, de forma a melhorar as propriedades físicas do papel, o PCC como carga mineral, o ASA como agente de colagem, o percol e a bentonite como agentes de retenção e o amido de massa catiónico como estabilizador da emulsão de ASA e como agente de resistência interna.

TABELA II

Características da matéria-prima usada na elaboração das folhas.

Matéria-Prima	Marca	Designação	Teor de Sólidos
Pasta branqueada	<i>Kraft</i>	Produzida em Portugal	<i>Eucalyptus globulus</i> 92 %
Amido de massa catiónico	Roquette	HI - CAT 1134 A	82 %
Carbonato de cálcio precipitado (PCC)	Specialty Minerals (Portugal), S.A.	Soporfil MFS + Soporfil LO	19,5 %
Agente de Retenção	CIBA Specialty Chemicals	Bentonite Hidrocol OM2LS	85 - 90%
Agente de Retenção	CIBA Specialty Chemicals	Percol 47	90- 100%

Como a recepção da pasta de *Eucalyptus globulus* foi feita em forma de fardo, o primeiro processo a que a pasta foi submetida foi à desintegração e de seguida à refinação no refinador *Valley* (ISO 5264-1). Depois de desintegrada, refinada foram elaboradas as folhas numa máquina laboratorial MK. As suspensões fibrosas alimentadas à máquina foram sujeitas a diferentes condições, tais como: várias concentrações de PCC (0, 10, 15, 20, 25 e 30%) relativamente à massa de fibra seca e ainda 20% de PCC conjuntamente com 50, 100 e 300 ppm de ião cálcio. A suspensão encontrava-se a 50°C e com pH de 8. No estudo do efeito da temperatura e do pH, estudou-se três temperaturas da suspensão (40, 50 e 60°C) para três valores de pH, 5, 8 e 11, em duas concentrações de ASA: 0,2 e 0,3% (relativamente à massa de fibra seca). Os reagentes e a matéria-prima foram adicionados, respeitando uma determinada ordem e intervalos de tempo, à suspensão fibrosa que se encontrava em agitação mecânica constante (1100 rpm). A máquina de produção de folhas laboratoriais era constituída por uma zona de agitação da suspensão e de formação da folha e uma zona de prensagem/secagem (110°C).

### C. Métodos analíticos

Depois de elaboradas as folhas foram colocadas num ambiente condicionado em termos de humidade e temperatura (50% RH e 23°C), segundo a norma ISO 187, para depois se proceder à execução dos métodos de avaliação do grau de colagem em igualdade de circunstâncias em todas as amostras.

O controlo da eficiência do grau de colagem interna com ASA foi levado a cabo por dois métodos como: o índice Cobb (norma ISO 535) e o ângulo de contacto. Estes métodos de caracterização do grau de colagem interna das folhas foram aplicados em ambos os lados da folha, ou seja, do lado liso e do lado rugoso da amostra. Os valores finais das medições são a média dos resultados obtidos de ambas as partes.

### 3. Resultados e Discussão

#### A. Efeito da concentração de PCC

O efeito da variação da concentração da carga mineral, neste caso o carbonato de cálcio precipitado (PCC), na colagem interna obtidos neste estudo encontra-se nas figuras 3.1 e 3.2.

As imagens da figura 3.1, para as diferentes emulsões, mostram dois resultados do Cobb, um mostra os valores do Cobb quando se tem uma determinada concentração de PCC na suspensão e outro mostra os valores do Cobb quando se tem determinada concentração de PCC no papel. Isto porque para se obter um determinado valor de PCC no papel foi necessário adicionar o dobro de PCC na suspensão, pois a retenção de PCC da máquina é de 50%. Ou seja, por exemplo para se obter uma concentração de PCC no papel de 30% foi necessário colocar 60% de PCC na suspensão fibrosa, o que afecta a colagem interna. Pela observação dos gráficos verifica-se que até 30% de PCC na suspensão não se verifica alteração do grau de colagem, mas quando se obtém a mesma concentração de PCC no papel já se verifica uma alteração no grau de colagem.

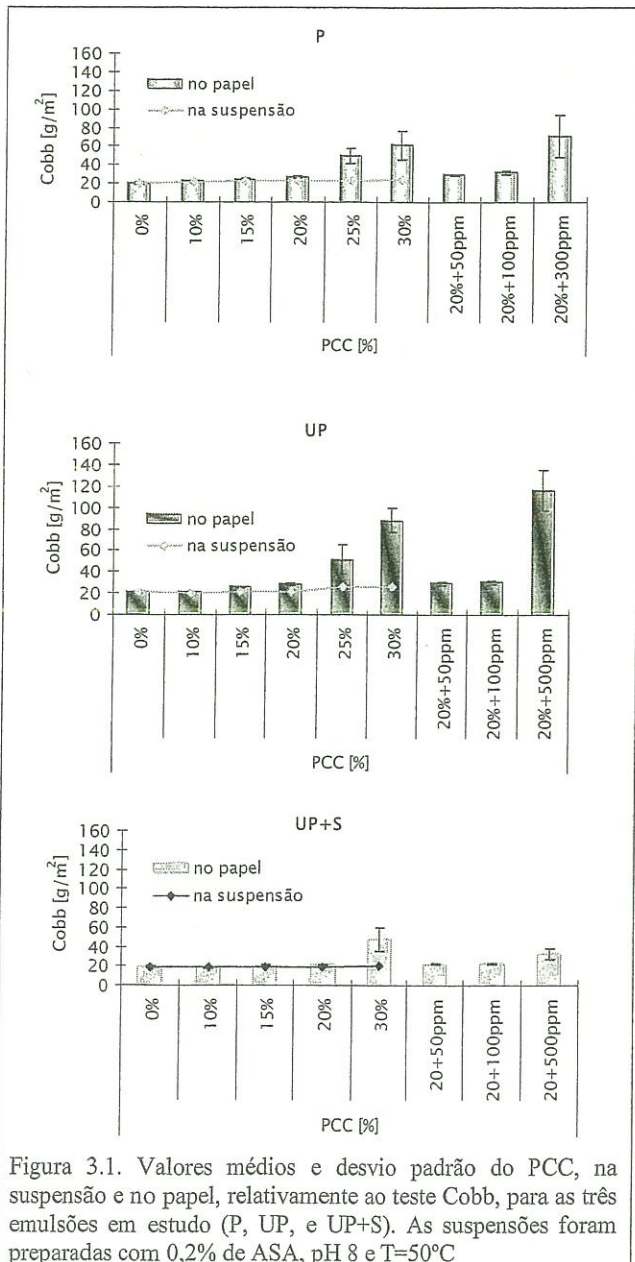


Figura 3.1. Valores médios e desvio padrão do PCC, na suspensão e no papel, relativamente ao teste Cobb, para as três emulsões em estudo (P, UP, e UP+S). As suspensões foram preparadas com 0,2% de ASA, pH 8 e T=50°C

As imagens da figura 3.2, para as diferentes emulsões, mostram os resultados dos ângulos de contacto para os papéis colados com as diferentes emulsões.

Os dois métodos não são muito concordante relativamente às concentrações de 25 e 30% de PCC. Enquanto que com o método Cobb obtêm-se valores favoráveis à colagem até aos 20% de PCC, o método ângulo de contacto sugere que até aos 30% de PCC a colagem é eficaz.

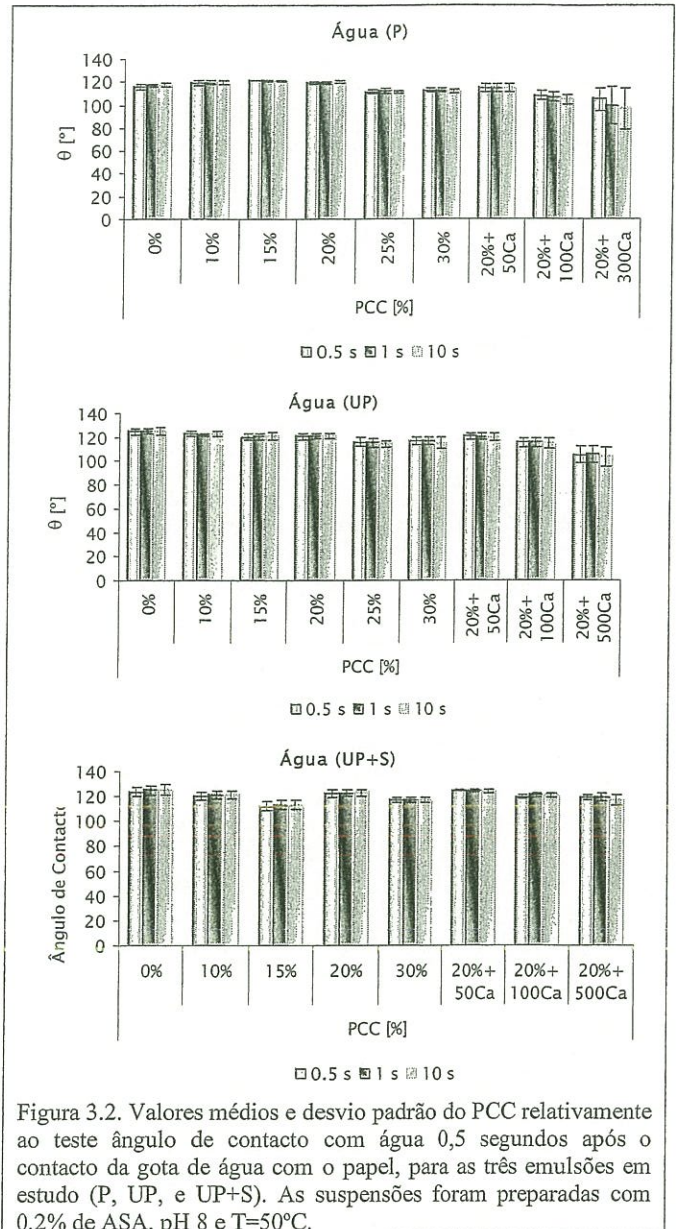


Figura 3.2. Valores médios e desvio padrão do PCC relativamente ao teste ângulo de contacto com água 0,5 segundos após o contacto da gota de água com o papel, para as três emulsões em estudo (P, UP, e UP+S). As suspensões foram preparadas com 0,2% de ASA, pH 8 e T=50°C.

Na indústria papelreira, no caso dos papéis de escritório, a gama de concentração de PCC no papel varia entre 15 a 30% relativamente à massa de fibra seca. Para completar o estudo pensou-se adicionar três níveis de concentrações de ião cálcio em suspensões com 20% de PCC. Os valores escolhidos de ião cálcio foram, 50, 100 e 300 ou 500 ppm, dependendo do valor onde se verificou alteração do grau de colagem nas diferentes emulsões. As três emulsões mostraram manter o grau de colagem nas misturas de 20% de PCC com 50 e com 100ppm de ião cálcio dissolvido, mostrando alteração na

eficácia da colagem quando se adicionou a mesma concentração de PCC para os valores máximos admissíveis de ião cálcio dissolvido.

Supõe-se que existem duas razões para a necessidade de aumentar a concentração de ASA com o aumento do nível de concentração de PCC: aumento da área superficial que necessita de ser “colada”; e a retenção de cargas é menor que a retenção de fibras celulósicas<sup>(7)</sup>. Estes aspectos são bem evidenciados neste trabalho, pois o aumento da concentração de PCC na suspensão para obter um determinado nível de PCC no papel teve consequências nefastas para a eficiência da colagem.

### B. Efeito do pH e da temperatura

Da figura 3.3 à 3.6 encontram-se os resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura e do pH em duas concentrações de ASA.

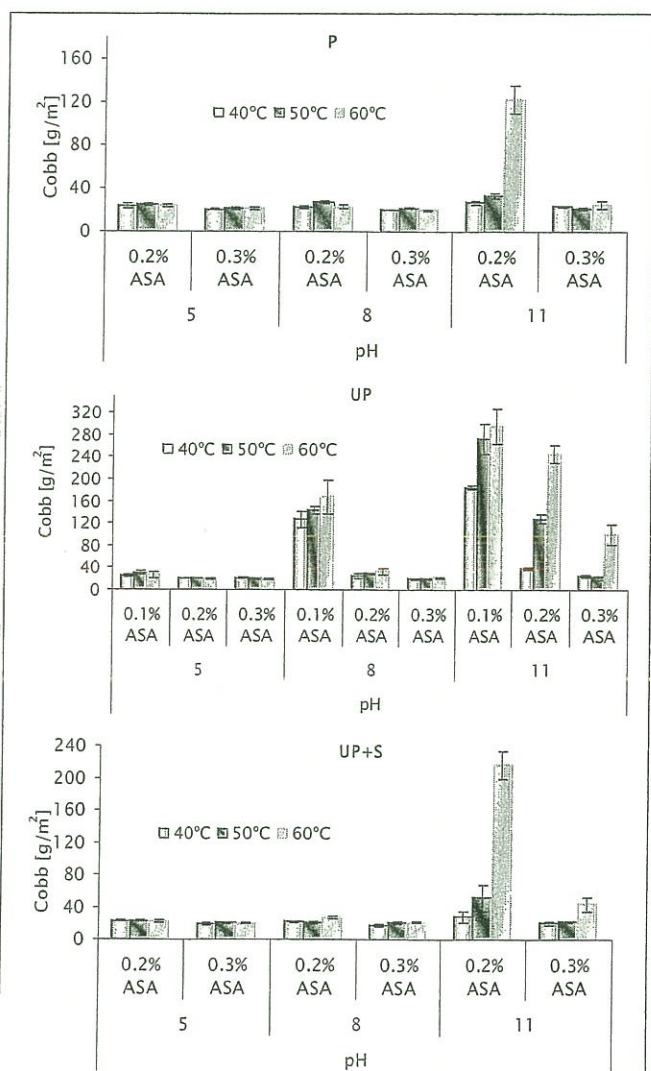


Figura 3.3. Valores médios e desvio padrão quanto ao efeito da temperatura e do pH, relativamente ao teste Cobb, para as três emulsões em estudo (P, UP, e UP+S). As suspensões foram preparadas com 0,2 e 0,3% de ASA, pH=5, 8 e 11, T=40, 50 e 60° C e PCC=20% (quando se usou pH=5 não se adicionou carga).

Pode observar-se que a combinação de temperaturas elevadas da suspensão conjuntamente com valor elevado de pH para concentrações de ASA na ordem dos 0,2%, para as três emulsões, mostra-se prejudicial para a colagem interna, verificando-se coerência nos dois métodos. No caso da emulsão UP fez-se ainda uma análise do efeito em questão com uma concentração de ASA ainda mais baixa de 0,1%, neste caso, apenas a colagem em meio ácido foi bem sucedida.

Pode-se verificar que, aliás, a colagem em meio ácido (pH=5) teve sempre bons resultados na eficiência do grau de colagem, mostrados por ambos os métodos analíticos de avaliação do grau de colagem. No que diz respeito ao processo neutro/alcalino os resultados mostraram-se óptimos em ambas as concentrações de ASA, à excepção de quando se trabalhou com pH 11 e T=60°C.

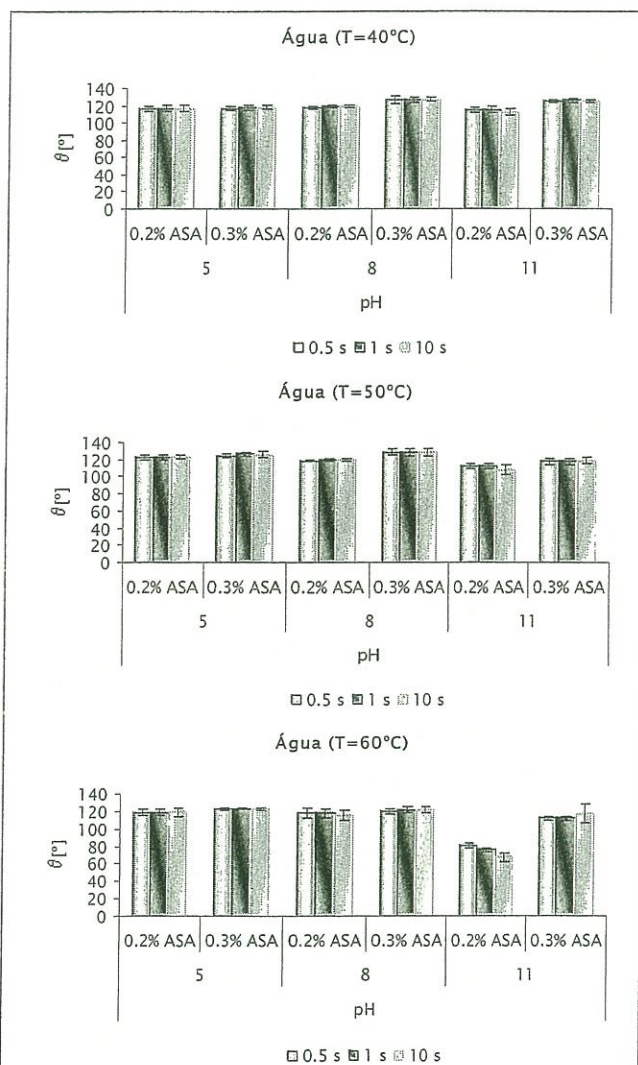


Figura 3.4. Valores médios e desvio padrão quanto ao efeito da temperatura e do pH, relativamente ao teste ângulo de contacto com água 0,5 segundos após o contacto da gota de água com o papel, para a emulsão P. As suspensões foram preparadas com 0,2 e 0,3% de ASA, pH=5, 8 e 11, T=40, 50 e 60° C e PCC=20% (quando se usou pH=5 não se adicionou carga).

Normalmente, não é possível ajustar a temperatura da suspensão fibrosa na máquina de papel, além disso, a tendência da temperatura aumentar é elevada, devido ao

encerramento dos circuitos de águas no sistema. Wasser<sup>(8)</sup> demonstrou que o tempo de desenvolvimento do grau de colagem diminui rapidamente com o aumento da temperatura, confirmando mais uma vez a influência da temperatura na reactividade do ASA.

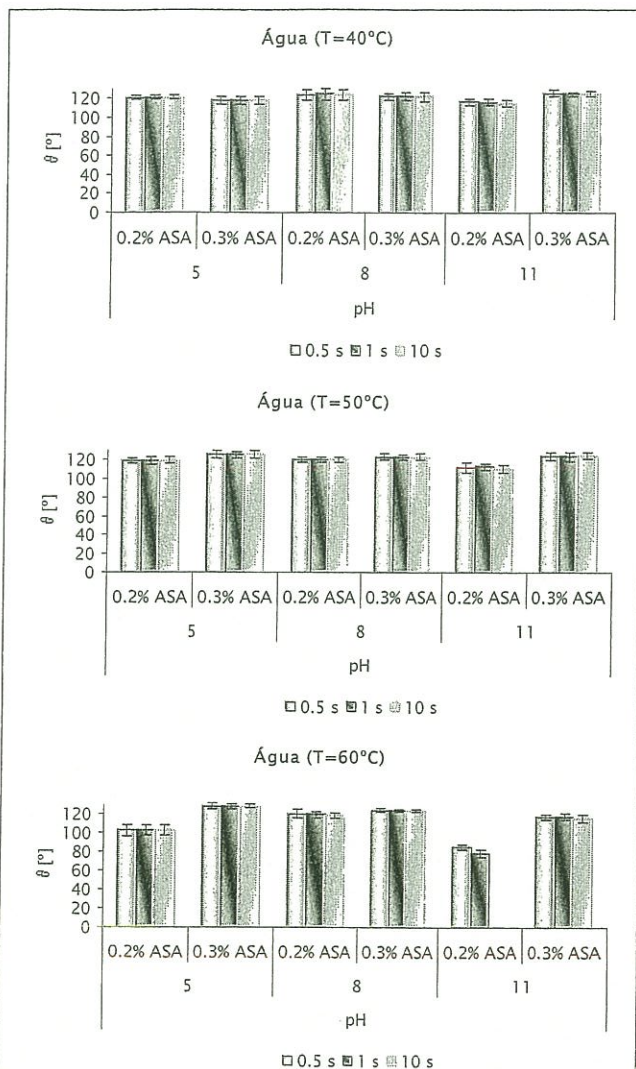


Figura 3.5. Valores médios e desvio padrão quanto ao efeito da temperatura e do pH, relativamente ao teste ângulo de contacto com água 0,5 segundos após o contacto da gota de água com o papel, para a emulsão UP. As suspensões foram preparadas com 0,2 e 0,3% de ASA, pH=5, 8 e 11, T=40, 50 e 60°C e PCC=20% (quando se usou pH=5 não se adicionou carga).

A combinação temperatura elevada e pH elevado mostra-se prejudicial à colagem interna com ASA, pois provavelmente, nesta zona de elevadas condições de temperatura e de pH, a reacção de hidrólise do ASA processa-se com velocidade superior à velocidade da reacção do ASA com a celulose. As condições óptimas averiguadas, para obter um nível máximo de colagem são, temperatura da suspensão inferior a 50°C e pH 8, no caso do processo neutro/alcalino e de temperatura da suspensão inferior a 60°C e pH 5, no caso do processo ácido.

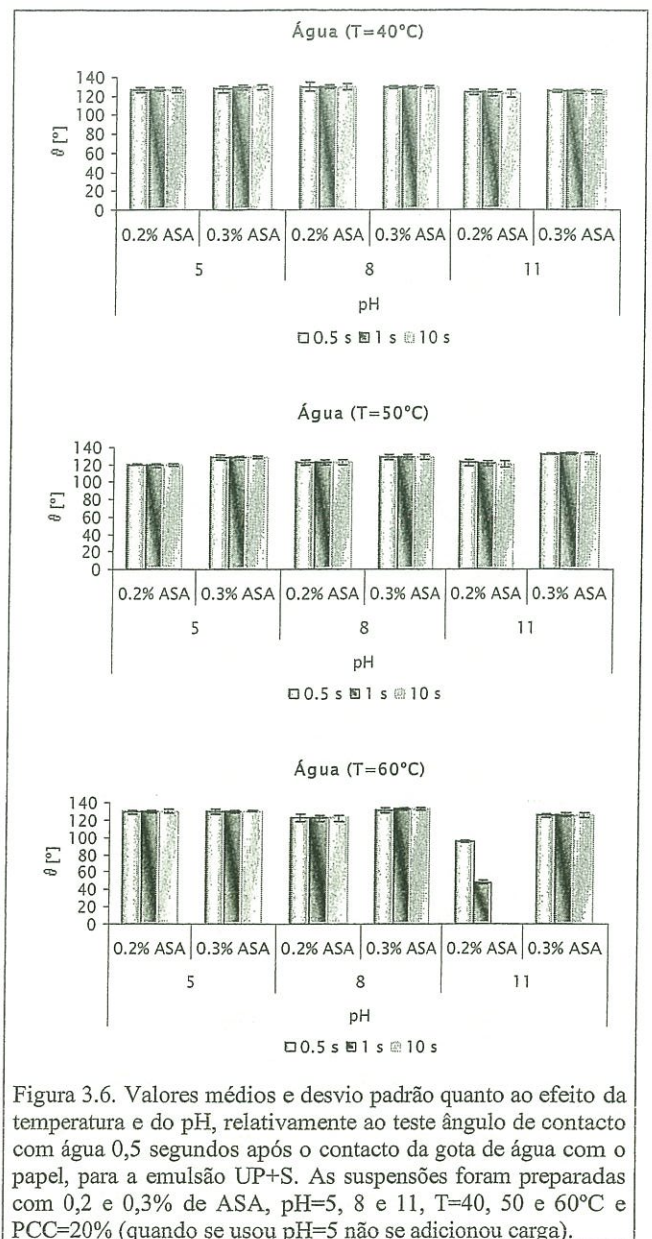


Figura 3.6. Valores médios e desvio padrão quanto ao efeito da temperatura e do pH, relativamente ao teste ângulo de contacto com água 0,5 segundos após o contacto da gota de água com o papel, para a emulsão UP+S. As suspensões foram preparadas com 0,2 e 0,3% de ASA, pH=5, 8 e 11, T=40, 50 e 60°C e PCC=20% (quando se usou pH=5 não se adicionou carga).

#### 4. Conclusões

As emulsões preparadas nas condições utilizadas neste trabalho laboratorial podem ser usadas na produção de folhas durante pelo menos 3 horas, sem que a sua estabilidade seja afectada. No caso da emulsão de ASA UP+S esse tempo pode-se prolongar até às 6 horas. De acordo com este estudo, obtiveram-se bons resultados na colagem interna com ASA quando se adiciona níveis de PCC até aproximadamente 30% relativamente à massa seca de fibra. As três emulsões estudadas mostraram manter o grau de colagem quando se misturou de 20% de PCC com 50 e com 100ppm de ião cálcio dissolvido. No entanto, mostraram alteração na eficácia da colagem quando se adicionou a mesma concentração de PCC mas com os valores máximos admissíveis de ião cálcio dissolvido. Enquanto que com o método Cobb obtêm-se valores favoráveis à colagem

até aos 20% de PCC, o método ângulo de contacto sugere que até aos 30% de PCC a colagem é eficaz. Estes resultados mostram a importância da escolha do método analítico para a caracterização de efeitos.

A combinação temperatura elevada e pH elevado mostra-se prejudicial à colagem interna com ASA, pois provavelmente, nesta zona de elevadas condições de temperatura e de pH, a reacção de hidrólise do ASA processa-se com velocidade superior à velocidade da reacção do ASA com a celulose. As condições óptimas averiguadas, para obter um nível máximo de colagem são, temperatura da suspensão inferior a 50°C e pH 8, no caso do processo neutro/alcalino e de temperatura da suspensão inferior a 60°C e pH 5, no caso do processo ácido.

### Agradecimentos

As autoras agradecem à Soporcel, ao Raiz e à Raisio-Portugal as facilidades proporcionadas para o desenvolvimento deste trabalho.

### Bibliografia

- (1) Neimo, Leo – Internal sizing of paper. Em Papermaking chemistry: Papermaking Science and Technology, TAPPI PRESS, Chapter 7, 1999.
- (2) Araújo, J.A., Oliveira I., Massoquette A., Patino O. A., Coelho G. A., Alexandre G. - Estudo laboratorial da colagem interna do papel com as colas ASA, AKD e , utilizando PCC e sulfato de cálcio diidratado como carga. 30<sup>th</sup> Pulp and Paper Annual Meeting, 1997.
- (3) Dumas, David H. - *An overview of cellulose-reactive sizes*. Tappi Journal, 64 (1): 43-46, 1981.
- (4) Farley, C. E., Wasser, R. B. - *Sizing with alkenyl succinic anhydride*. Em *The sizing of paper*: Second edition. Editado por W. F. Reynold. Tappi Press, p. 51-61, 1989.
- (5) Wasser, R. B. - The reactivity of alkenyl succinic anhydride: its pertinence with respect to alkaline sizing. *Journal of pulp and paper science*, 13 (1): 29-32, 1987.
- (6) Savolainen, R. M. - *The effects of temperature, pH and alkalinity on ASA sizing in alkaline papermaking*. Livro de conferências. Philadelphia, USA: 24-27 Mar., p. 289-295, 1996.
- (7) Cates, Dumas, Evans - *The sizing of paper*, Reynolds, W.F. (ed.), TAPPI PRESS, p. 33, 1989.
- (8) Wasser, R. B. - The reactivity of alkenyl succinic anhydride: its pertinence with respect to alkaline sizing. *Journal of pulp and paper science*, 13 (1): 29-32, 1987.

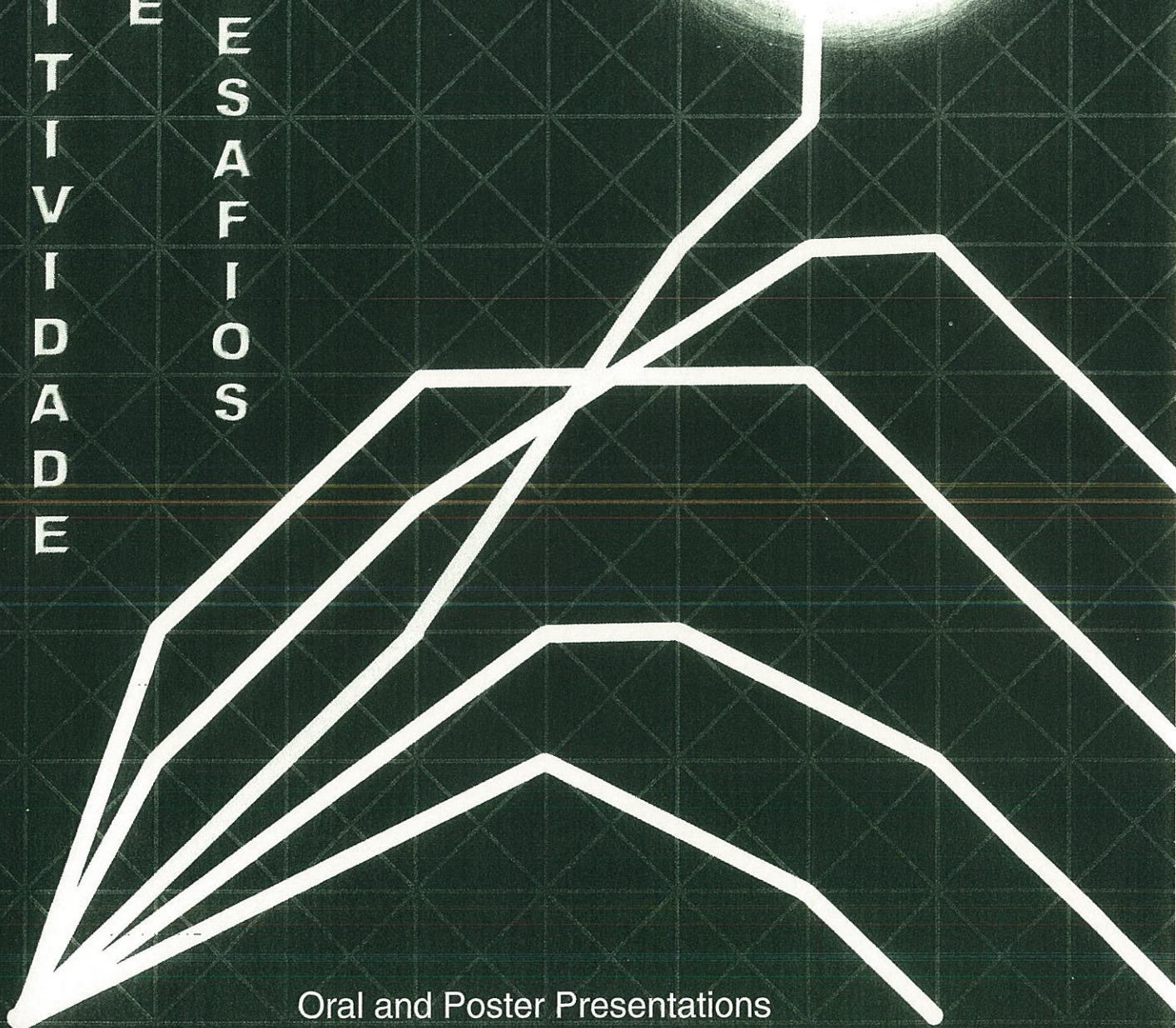
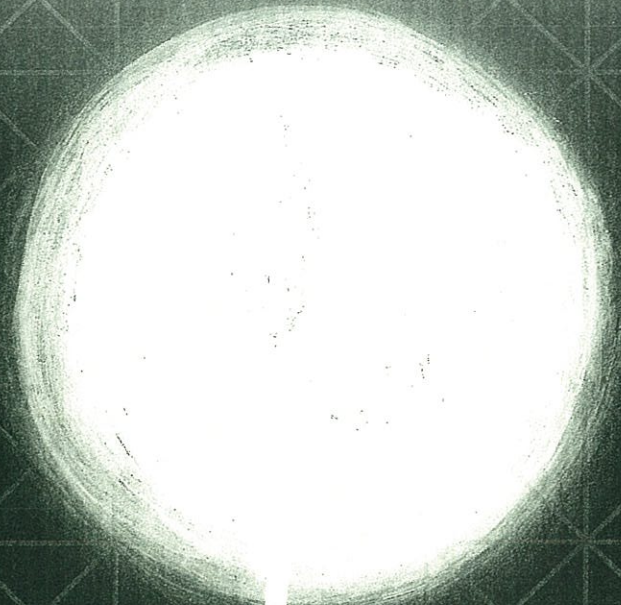
## ***Anexo XII***

---

N. Gil, C. Gil, M. E. Amaral, A. P. Costa, A. P. Duarte (2007). “Biorefinação- Uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*”, XX Encontro Nacional da Tecnicelpa, 135-141, 10-12 outubro 2007, Tomar, Portugal

COMPETITIVIDADE

NOVOS  
DESAFIOS



Oral and Poster Presentations

**TECNICELPA**

XX ENCONTRO NACIONAL

TOMAR 10-12 OUTUBRO 2007

[www.tecnicelpa.com](http://www.tecnicelpa.com)

# BIOREFINAÇÃO – USO DE ENZIMAS NO MELHORAMENTO DA REFINAÇÃO DE UMA PASTA KRAFT BRANQUEADA DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*

Nuno Gil<sup>1</sup>, Cristina Gil<sup>1,2</sup>, Maria Emília Amaral<sup>1,2</sup>, Ana Paula Costa<sup>1,2</sup> e Ana Paula Duarte<sup>1,2\*</sup>

## SUMÁRIO

Dois tipos de misturas comerciais de enzimas, a Celluclast (mistura de celulasas) e a Viscozyme L (mistura de beta-glucanase), foram usadas com diferentes dosagens e tempos de reacção, para melhorar a refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. O tratamento enzimático aumenta cerca de 80% o grau Schopper-Riegler (°SR) para o mesmo nível de energia de refinação (1500 revoluções PFI). De modo a avaliar a eventual degradação introduzida pelas enzimas foram determinadas as viscosidades das pastas antes e depois dos tratamentos enzimáticos. Os resultados estão concordantes com os obtidos para o comprimento das fibras, onde apenas ocorreu uma fraca diminuição desta propriedade. Este estudo foi complementado com a quantificação dos açúcares libertados nos filtrados dos tratamentos enzimáticos, antes e depois da refinação. As propriedades de resistência das pastas não foram significativamente afectadas com a aplicação das enzimas, tendo-se mesmo verificado uma melhoria na coesão interna.

**Palavras-chave:** Biorefinação; Enzimas; Pasta de *Eucalyptus globulus*; Hidrólise; Propriedades físicas

## SUMMARY

Two commercial enzymes mix Celluclast (cellulases mixture) and Viscozyme (beta-glucanase mixture) were used to improve the refining process of an *Eucalyptus globulus* bleached kraft pulp. This treatment improved the Schopper-Riegler degree (°SR) by up 80% at the same level of refining energy (1500 PFI revolutions). The pulp degradation was evaluated by the pulp viscosity determination, which was in agreement with the fiber length determination that showed a slight diminution with the enzymatic treatment. The carbohydrate determination in the filtrates complemented this study. The strength properties of the pulp were not affected by this treatment, it was even observed an increase in internal cohesion.

**Key words:** Biorefining; Enzymes; *Eucalyptus globulus* Pulp; Hydrolysis; Physical properties

## INTRODUÇÃO

O uso de enzimas na indústria de pasta e papel sofreu um grande desenvolvimento nas duas últimas décadas. As enzimas celulolíticas têm sido intensivamente investigadas e usadas em várias aplicações, embora em muitas áreas ainda estejam em desenvolvimento. A reciclagem do papel é uma área onde a utilização de enzimas tem sido implementada, uma vez que as fibras recicladas podem ser melhoradas através de tratamentos com celulasas e hemicelulasas. De facto, estas enzimas modificam as propriedades interfaciais das fibras, aumentando a afinidade para a água, o que por sua vez provoca alterações nas propriedades técnicas da pasta

<sup>1</sup> Unidade de Investigação de Materiais Têxteis e Papeleiros, <sup>2</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel, Universidade da Beira Interior, 6200-001 Covilhã.  
E-mail de contacto: apduarte@ubi.pt.

e do papel, como a drenabilidade e a resistência do papel (Dienes *et al.* 2004; Oksanen *et al.* 2002; Pala *et al.* 2002). A destintagem de fibras secundárias tem sido outra utilização para estas enzimas (Pèlach *et al.* 2003).

A influência destas enzimas nas fibras de espécies de madeira Portuguesas foi estudada pelo nosso grupo de trabalho (Spiridon e Duarte 2004; Spiridon *et al.* 2001a e b) e os resultados obtidos mostraram que celulasas e hemicelulasas comerciais influenciavam as propriedades papelarias das pastas kraft cruas de *Eucalyptus globulus* e de *Pinus pinaster*. Este grupo de trabalho mostrou ainda que o tratamento das fibras de pastas kraft cruas de *Pinus pinaster* com xilanases comerciais dava origem a um aumento na sua flexibilidade com a consequente melhoria na capacidade de ligação inter fibras (Spiridon *et al.* 2003).

O uso de xilanases como activadores de branqueamento tem sido também uma aplicação biotecnológica na indústria de pasta e papel. O uso destas enzimas aumenta significativamente a branqueabilidade da pasta, uma vez que melhora a acessibilidade dos agentes químicos do branqueamento para as fibras (Roncero *et al.* 2005 e 2000; Shah *et al.* 2000).

O tratamento de fibras provenientes de diversas origens (pastas kraft cruas de resinosas, papel reciclado de cartão canelado) com diferentes celulasas e hemicelulasas comerciais resulta na redução do consumo energético durante a refinação. Esta economia é conseguida por redução do tempo de refinação para atingir os mesmos níveis de refinação, sem afectar as propriedades de resistência da pasta (Bhardwaj *et al.* 1996). Resultados semelhantes foram encontrados para a xilanase purificada obtida a partir do fungo *Trichoderma reesei* (Wong *et al.* 1999). Estes resultados são mais notórios quando os tratamentos são efectuados em pastas secas em vez de pastas nunca secas (Garcia *et al.* 2002) e os melhores resultados foram encontrados com celulasas purificadas em vez de misturas (Pere *et al.* 2000 e 1995).

O consumo de energia na indústria de pasta e papel é elevado, contribuindo em cerca de 18% do custo de produção. Para o desenvolvimento das propriedades pretendidas, uma pasta tem de ser sujeita ao processo de refinação, o qual representa 18% a 25% do total de energia eléctrica requerida para produzir papel (Bajpai *et al.* 2006; Bhardwaj *et al.* 1996). Devido à escassez em energia disponível e ao elevado custo energético, a conservação de energia tornou-se uma necessidade para a indústria papelaria. Consequentemente, qualquer tratamento à pasta que implique uma diminuição no consumo em energia, nomeadamente no que diz respeito à operação de refinação, terá um efeito benéfico no consumo global de energia na indústria. O uso de enzimas foi também testado numa escala industrial, mostrando que se reduziu o requisito energético em 25 kWh/ton de pasta (Bajpai *et al.* 2006).

Neste trabalho avaliou-se o resultado do tratamento de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* com duas misturas comerciais, uma de celulasas e outra de beta-glucanase. O efeito destas enzimas na biorefinação foi avaliado para diferentes dosagens e tempos de reacção em termos de açúcares hidrolisados, propriedades de drenabilidade das pastas e das propriedades físicas das folhas de papel produzidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Materiais.** A matéria-prima utilizada neste trabalho foi uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* industrial, com uma viscosidade de 853 mL.g<sup>-1</sup>. Usaram-se enzimas comerciais (Novo Nordisk) designadamente a Celluclast 1.5 L, uma mistura de celulasas, produzida a partir de uma estirpe seleccionada do fungo *Trichoderma reesei* e a Viscozyme L, mistura de enzimas degradativas dos hidratos de carbono (arabanase, celulase, beta-glucanase, hemicelulase e xilanase) com maior actividade enzimática para a beta-glucanase. A Viscozyme foi produzida a partir de uma estirpe seleccionada do fungo *Aspergillus aculeatus*.

**Tratamento enzimático.** A pasta foi tratada com 1, 2 e 4 UI de celulases (cel) e de beta-glucanase (bgluc) por grama de pasta. Este tratamento foi realizado em sacos de polietileno nas seguintes condições: 5% de consistência, temperatura de 50°C, tempo de reacção de 1 hora (agitação manual de 10 em 10 minutos). O pH da suspensão foi ajustado a pH= 5 para as celulases e a pH = 4,3 para a beta-glucanase, usando uma solução diluída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No caso da beta-glucanase foram ensaiados mais dois tempos de reacção (2 e 4 horas), e o tratamento foi efectuado em copos de precipitação, com agitação mecânica contínua. A reacção foi interrompida por lavagem com água desionizada até pH neutro. A pasta de controlo foi tratada em paralelo e de modo semelhante, sem adição de enzima.

**Caracterização dos açúcares nos filtrados.** Os filtrados dos tratamentos enzimáticos foram evaporados até resíduo seco, e este foi hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de modo a transformar os eventuais oligossacarídeos em açúcares redutores. A quantificação destes açúcares foi efectuada por determinação espectrofotométrica usando o ácido 3,5-dinitrossalicílico de acordo com o método referido por Miller (1959).

**Caracterização da pasta.** As propriedades morfológicas foram determinadas automaticamente por análise de imagem de uma suspensão diluída que passa numa câmara de fluxo, no equipamento MORFI®. A viscosidade das pastas foi determinada antes e depois do tratamento enzimático, de acordo com a norma ISO 5351/1. Todas as amostras de pasta foram refinadas no refinador PFI com uma consistência de 10% e uma intensidade de refinação de 3,33 N/mm. Posteriormente foram caracterizadas, determinando-se o grau Shopper-Riegler (°SR) de acordo com a norma ISO 5267/1 e o grau de retenção de água WRV (*water retention value*), de acordo com o método referido por Silvy e colaboradores (1968). As folhas laboratoriais foram preparadas de acordo com a norma ISO 5269/1. As propriedades mecânicas e estruturais das folhas foram medidas de acordo com as respectivas normas ISO.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Acção das enzimas.** A acção hidrolítica das enzimas sobre as fibras, foi verificada através da quantificação dos açúcares libertados no filtrado dos tratamentos enzimáticos. A figura 1 mostra os açúcares redutores totais libertados após os pré-tratamentos enzimáticos, indicando que a acção hidrolítica das celulases é superior à da beta-glucanase, e essa acção aumenta com a dosagem de enzima, como era de esperar.

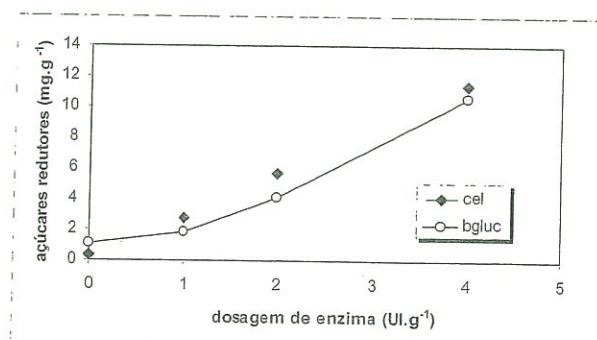


Figura 1 – Açúcares redutores totais libertados por grama de pasta para as diferentes dosagens de enzimas

Alguns autores consideram a hidrólise da pasta dentro de valores aceitáveis quando esta é menor que 3% (Pere *et al.* 2000). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que essa hidrólise não ultrapassou os 1,1% o que indica que este tratamento não degradou substancialmente a pasta. A acção hidrolítica sobre as pastas pode também ser estimada ao nível do grau de polimerização da celulose, aqui avaliada através da determinação da viscosidade da pasta (Figura 2).

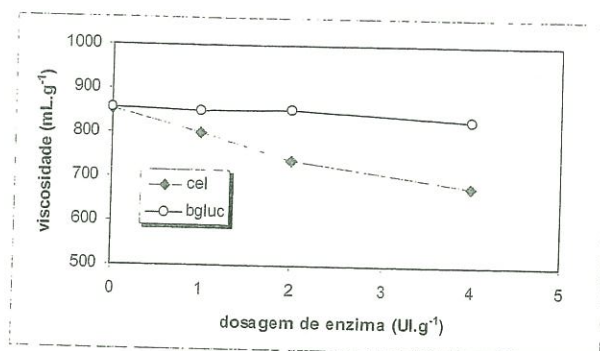


Figura 2 – Viscosidade das pastas em função das diferentes dosagens de enzimas

Esta figura mostra que a acção hidrolítica das celulases é mais notória do que a da beta-glucanase, sendo que neste caso praticamente não se observa diminuição, estando concordante com os resultados obtidos para os açúcares. As características biométricas das fibras foram analisadas, a que melhor traduziu a degradação da fibra foi o comprimento, mostrando que, mesmo com a variável refinação, o efeito das diferentes dosagens de enzimas na degradação não foi significativa (Tabela 1). Esta acção das enzimas sobre as fibras irá ser preponderante nos efeitos observados nas propriedades, como veremos posteriormente.

Tabela 1 – Efeito do tratamento enzimático e da refinação no comprimento médio ponderado em comprimento das fibras

Dosagem	Comprimento médio ponderado em comprimento (mm)							
	0 UI		1 UI		2 UI		4 UI	
	cel	bgluc	cel	bgluc	cel	bgluc	cel	bgluc
0 rev. PFI	0,811	0,801	0,809	0,803	0,806	0,804	0,804	0,803
1500 rev. PFI	0,796	0,796	0,773	0,794	0,730	0,794	0,667	0,787

**Efeito do tratamento enzimático na refinação.** O pré-tratamento enzimático, em especial com as celulases, permite uma melhoria no comportamento da pasta no que respeita ao processo de refinação, em termos de índice de drenagem. Os gráficos da figura 3 mostram um aumento evidente do °SR para as pastas submetidas ao pré-tratamento com celulases relativamente às não tratadas, este efeito é especialmente visível para as 1500 revoluções, onde se verifica um aumento de 80%.

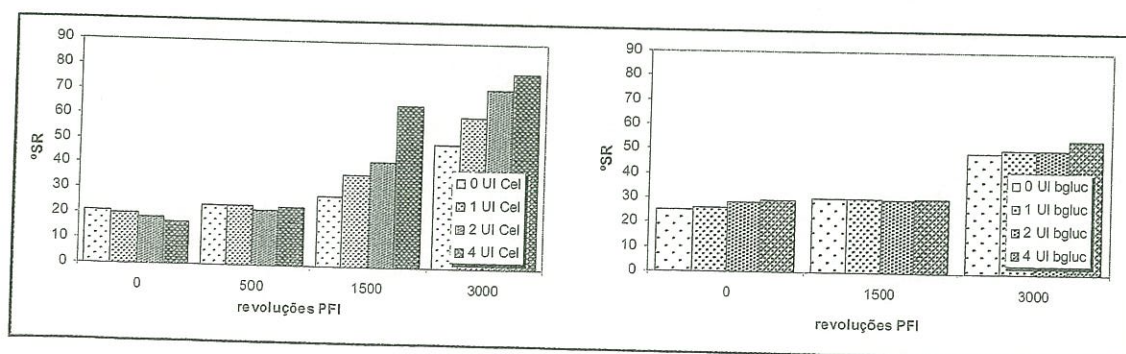


Figura 3 – Evolução do grau Schopper-Riegler (°SR) com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase

O efeito das enzimas para este grau de refinação pode ser explicado pelo aumento na fibrilação externa provocada pela acção das enzimas, o que é bem visível nas imagens obtidas por microscopia óptica de campo escuro, como se observa na figura 4.

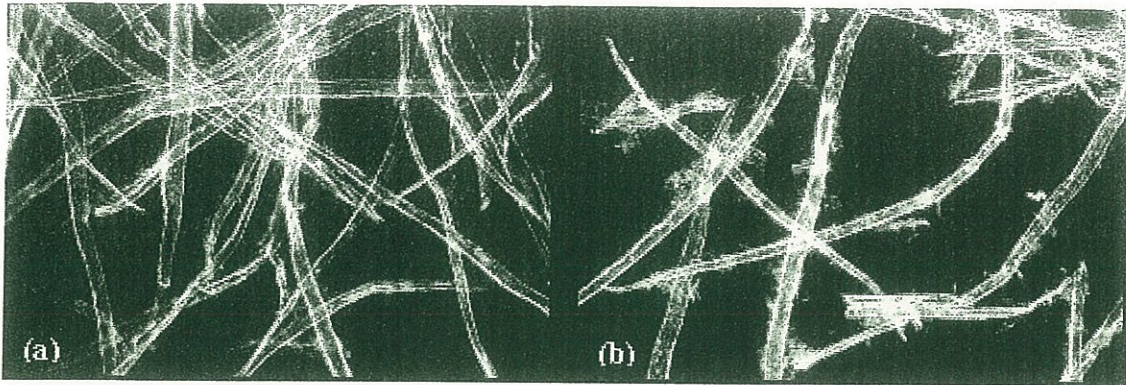


Figura 4 – Microfotografias para a pasta refinada a 1500 rev (a) sem tratamento enzimático, (b) com 4 UI de celulasas

Esta modificação significativa no comportamento da pasta a 1500 revoluções PFI é também observada na libertação dos açúcares durante o processo de refinação e novamente para as celulasas, como se pode ver na figura 5. No que respeita à beta-glucanase e para as mesmas revoluções PFI esse efeito não é tão visível, sendo mais evidenciado para as 3000 revoluções PFI. Os açúcares redutores foram determinados num filtrado recolhido após a refinação.

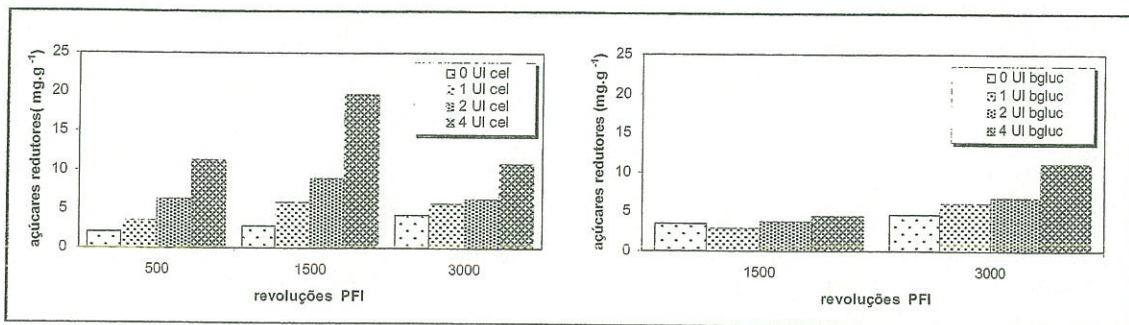


Figura 5 – Evolução dos açúcares redutores totais libertados por grama de pasta com a refinação para as pastas tratadas com celulasas e com beta-glucanase

A hidratação da fibra durante a refinação, medida pelo WRV segue a tendência do grau Schopper-Riegler (Figura 6). Para o mesmo tempo de tratamento e nível de refinação, a adição de celulasas à pasta mostra um aumento de 17% no WRV, ao passo que para a beta-glucanase o aumento é apenas de 6%. Este efeito mais evidenciado aquando da adição de celulasas, resulta provavelmente do facto destas enzimas degradarem mais a parede celular, dando origem a uma maior superfície exposta susceptível de estabelecer ligações com as moléculas de água e assim contribuir para uma maior hidratação.

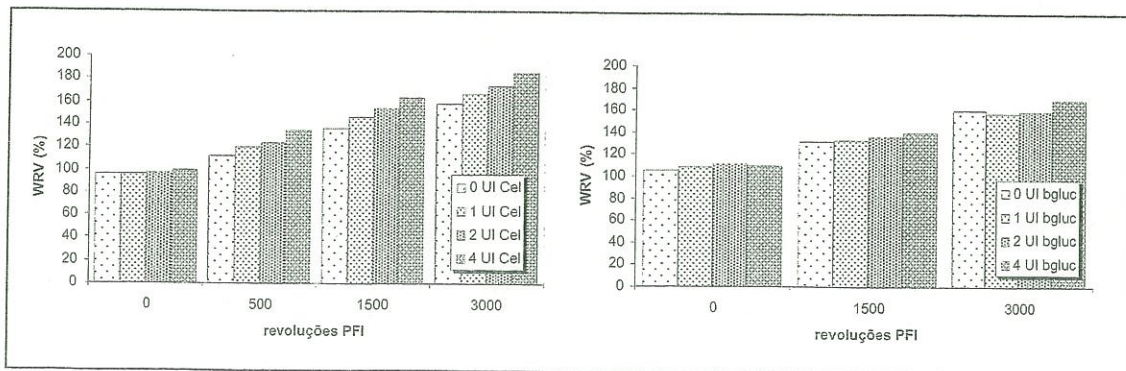


Figura 6 – Evolução do WRV com a refinação para as pastas tratadas com celulasas e com beta-glucanase

**Efeito do tratamento enzimático nas propriedades da pasta.** Como foi já referido, a acção das enzimas na degradação das hemiceluloses traduz-se numa maior ou menor degradação das fibras, a qual pode manifestar-se numa deterioração das propriedades físico-mecânicas das pastas. A resistência à tracção (Figura 7) para as pastas tratadas com celulases apresenta uma ligeira melhoria, sendo esta apenas contrariada com o incremento de concentração de enzima e de nível de refinação. No caso das pastas tratadas com beta-glucanase a tendência é semelhante, mas os efeitos são menos notórios.

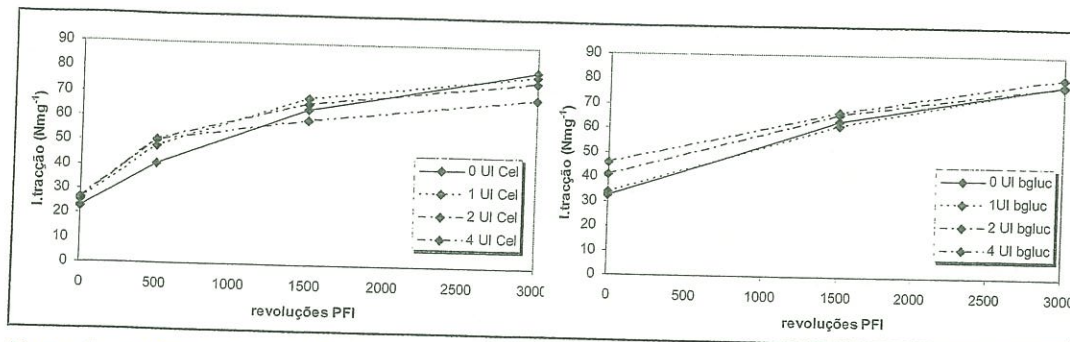


Figura 7 – Evolução da resistência à tracção com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase

A figura 8 mostra a evolução da coesão interna, observando-se que esta propriedade foi significativamente incrementada pelo tratamento enzimático. Este facto pode ser explicado pelo aumento da fibrilação externa, já anteriormente referido e mostrado na figura 4.

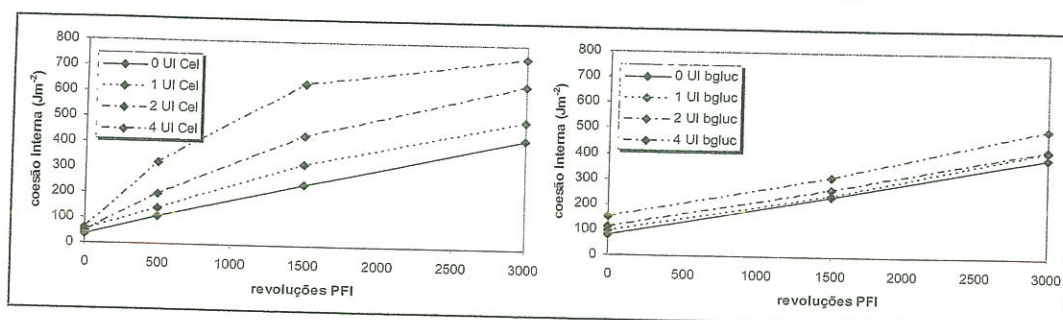


Figura 8 – Evolução da coesão interna com a refinação para as pastas tratadas com celulases e com beta-glucanase

**Efeito do tempo de tratamento nas propriedades da pasta.** No caso da beta-glucanase, foi ainda estudado o efeito do tempo de tratamento, dado que uma hora de reacção não introduziu grandes alterações. A figura 9 mostra que apesar do efeito benéfico do tempo de reacção sobre o  $^{\circ}\text{SR}$ , com um incremento de 57%, ocorreu no entanto uma diminuição de 34% na resistência intrínseca da pasta.

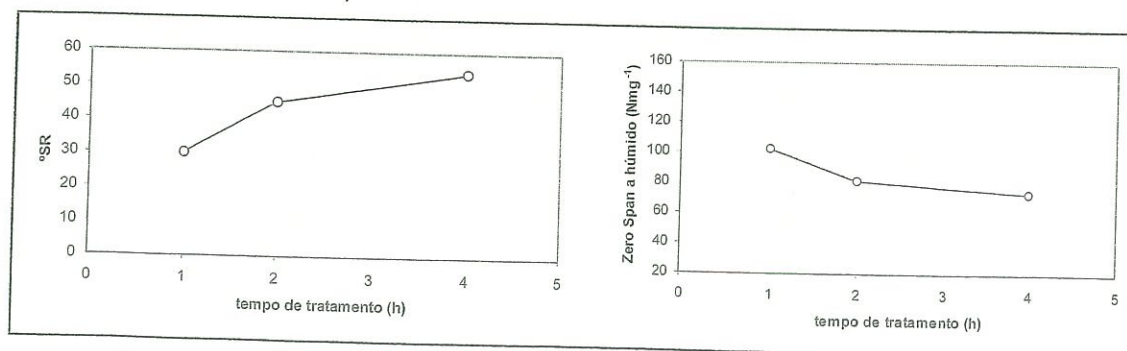


Figura 9 – Evolução do  $^{\circ}\text{SR}$  e da resistência à tracção à distância zero (zero span) para a beta-glucanase com diferentes tempos de reacção

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a biotecnologia pode contribuir de forma positiva para a indústria de pasta e papel. Este trabalho mostrou que a acção de um tratamento enzimático antes da refinação aumenta o índice de drenagem da pasta e o grau de hidratação das fibras, sendo este efeito mais visível no caso da adição das celulases. Este comportamento permite adiantar que para se atingir um determinado grau de refinação, a quantidade de energia a fornecer é menor. O efeito das enzimas ensaiadas sobre as propriedades da pasta, apesar de no caso das celulases se ter observado alguma degradação das fibras, não pode ser considerado nefasto para as propriedades de resistência da pasta, apresentando mesmo um aumento no caso da coesão interna. Para a beta-glucanase o melhor desempenho na refinabilidade surge para tempos de reacção elevados, no entanto a resistência intrínseca da fibra é ligeiramente afectada.

## REFERÊNCIAS

- Bajpai, P., Mishra, S.P., Mishra, O. P., Kumar, S. and Bajpai, P.K. (2006). *Tappi Journal*. **5(11)**: 25-32.
- Bhardwaj, N.K., Bajpai, P., Bajpai, P.K. (1996). *Journal of Biotechnology*. **51**: 21-26.
- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K. (2004). *Industrial Crops and Products*. **20**: 11-21.
- García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Díaz, P., Vidal, T.(2002). *Cellulose*. **9**: 115-125.
- Miller, G. L. (1959). *Anal. Chemistry*. **31**: 426-431.
- Oksanen, T., Pere, J., Paavilainen, L., Buchert, J., Viikari, L.(2000). *Journal. of Biotechnology*. **78**: 39-48.
- Pala, H., Mota, M., Gama, F.M. (2002). *Biocatalysis and Biotransformation*. **20(5)**: 353-361.
- Pèlach, M.A., Pastor, F. J., Puig, J., Vilseca, F., Mutjé, P.(2003). *Process Biochemistry*. **38(7)**: 1063-1067.
- Pere, J., Siika-aho, M., Buchert, J., Viikari, L. (1995). *Tappi Journal*. **78(6)**: 71-78.
- Pere, J., Siika-aho, M., Viikari, L. (2000). *Tappi Journal*. **83(5)**: 1-8.
- Shah, A.K., Cooper, D., Adolphson, R., Eriksson, K.-E.L. (2000). *Journal of Pulp and Paper Science*, **26(1)**: 8-11.
- Silvy, J., Romatier, G., Chiodi, R.(1968). *Revue A.T.I.P.*. **22**: 31-53.
- Spiridon, I., Belgacem, M.N., Duarte, A.P. (2001a).** *Cell. Chem. Technol.*, **35(3-4)**: 243-251.
- Spiridon, I., Duarte, A.P., Belgacem, M.N.(2001b).** *Appita Journal*. **54(5)**: 457-459.
- Spiridon, I., Duarte, A.P., Curto, J. (2003). *Cell. Chem. Technology*. **37(5-6)**: 497-504.
- Spiridon, I., Duarte, A.P.(2004). *Cell. Chem. Technology*. **38(1-2)**: 59-65.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T. (2000). *Process Biochemistry*. **36**: 45-50.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T. (2005). *Bioresource Technology*. **96**: 21-30.
- Wong, K.K.Y., Kibblewhite, R.P., Signal, F.A. (1999). *J. Wood Chemistry and Technology*. **19(3)**, 205-212.

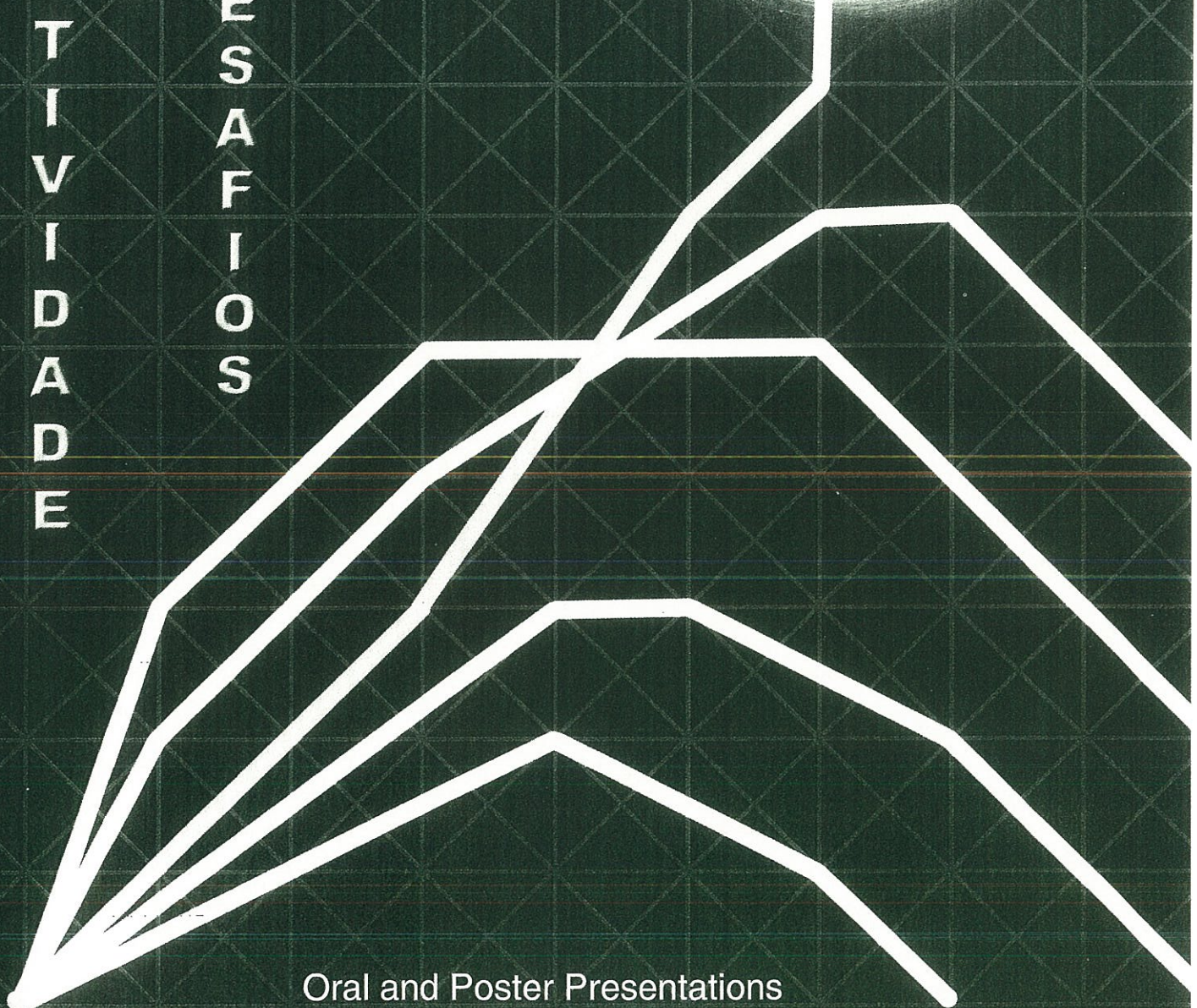
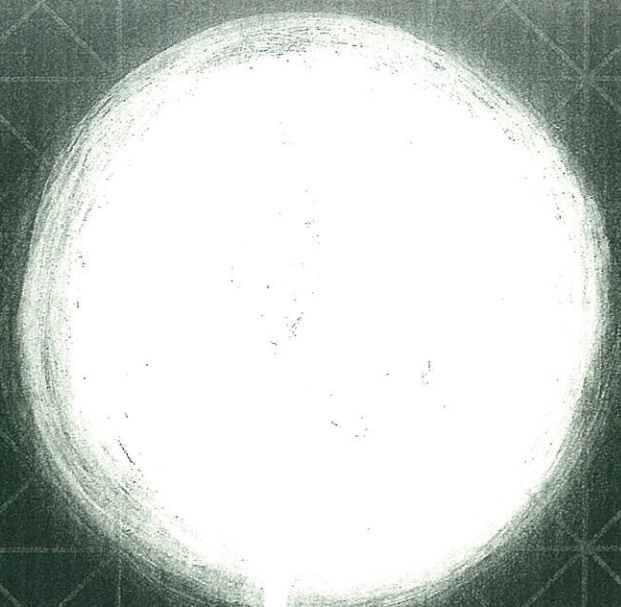
## ***Anexo XIII***

---

J. Curto, C. Gil, E. Conceição, A. Portugal, R. Simões (2007). Estudo comparativo da incorporação de fibra de Pinus pinaster branqueada no papel de Eucalyptus globulus, XX Encontro Nacional da Tecnicelpa, 29-35, 10-12 outubro 2007, Tomar, Portugal

COMPETITIVIDADE

NOVOS DESAFIOS



Oral and Poster Presentations

# TECNICELPA

XX ENCONTRO NACIONAL

TOMAR 10-12 OUTUBRO 2007

[www.tecnicelpa.com](http://www.tecnicelpa.com)

# ESTUDO COMPARATIVO DA INCORPORAÇÃO DE FIBRA DE *PINUS PINASTER* BRANQUEADA NO PAPEL DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*

Joana Curto<sup>1</sup>, Cristina Gil<sup>1</sup>, Eduardo Conceição<sup>2</sup>, António Portugal<sup>2</sup> e Rogério Simões\*<sup>1</sup>

## ABSTRACT

Office paper is the principal Portuguese paper industry product. This paper is mainly produced from *Eucalyptus globulus* bleached kraft pulp with a small incorporation of a softwood pulp, called reinforcement pulp, to increase paper strength. Despite *Pinus pinaster* being one of the most important species of the Portuguese forest, with the major forest area, Portugal does not bleach this pulp and imports bleached softwood pulp. To evaluate the Portuguese Pine reinforcement potential, the pulp was bleached in the laboratory and compared with a reference softwood market pulp. The Portuguese fibres exhibit higher coarseness (45%), length (13%) and width (15%) than the market pulp. In this study the goal is to quantify the influence of beating degree and long fibres incorporation level on the reinforcement of *Eucalyptus globulus* based paper. The contribution of two reinforcement pulp fibres with different biometry and coarsenesses to the final paper properties is done with an experimental plan that includes the following steps: evaluation of each raw material separately; incorporation of long fibres, using pulps with the same beating revolution number; incorporation of long fibres, using approximately the same beating degree, measured as °SR; evaluation of wet paper strength. The conclusions pointed out that, with the optimal beating, the Portuguese Pine improves tearing and tensile strength of the Eucalyptus based paper being possible to obtain equivalent or greater performance than using the market pulp. Paper properties have been found to be non linear in relation to pulp mixture proportions.

## INTRODUÇÃO

Na produção de papel de escritório a função principal da fibra de reforço é aumentar a “runnability” do processo de produção de papel, minimizando a ocorrência de quebras. Sendo esta uma variável de processo, uma das questões que tem que ser analisada é qual das propriedades de resistência melhor se correlaciona com a frequência de quebras. Esta questão foi discutida em várias publicações (Uesaka *et al.* 2001, Niskanen *et al.* 1998), tendo-se utilizado, de uma forma geral, os testes de rasgamento fora do plano para avaliar a capacidade de resistência às quebras. Alguns autores têm evidenciado também a importância de testes de fractura no plano (Niskanen *et al.* 1998, Page e Seth 1982, Van den Akker *et al.* 1967). Os trabalhos publicados indicam que a maior parte das quebras têm origem em pequenas imperfeições na estrutura e em picos de tensão (Moilanen e Lindqvist 1996, Roisum 1990, Page e Seth 1982, Sears *et al.* 1965). Assim, o comportamento reológico do material em estado húmido e seco é determinante do seu desempenho. Para caracterizar a resistência pode utilizar-se o índice de tracção e o “elastic stretch”, i.e. a resistência à tracção sobre o módulo de elasticidade, como defende Uesaka num estudo para a zona de prensagem (Uesaka *et al.* 2001). Por outro lado, vários autores concluem que as propriedades do papel obtido pela mistura de fibras não são linearmente aditivas em relação às proporções mássicas das matérias-primas que as constituem (Retulainen 1997, Mohlin e Wennberg 1984, Parsons 1969). De entre as teorias explicativas do comportamento das misturas podem referir-se a de Mohlin (Mohlin e Wennberg 1984), que propõe que na mistura se formam duas redes distintas e outra que evidencia o papel da activação das fibras (Niskanen *et al.* 1998).

Actualmente, Portugal não produz fibra longa branqueada e recorre à sua importação. Uma vez que a fibra longa portuguesa apresenta características morfológicas diferentes da importada, com comprimento e espessura de parede superiores, a viabilidade da sua utiliza-

<sup>1</sup> Universidade da Beira Interior, Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel.

<sup>2</sup> Universidade de Coimbra, Departamento de Engenharia Química.

Email de contacto: joana.curto@ubi.pt; rog.simo@ubi.pt.

ção depende do conhecimento do seu comportamento nas diferentes etapas do processo de produção de papel. Com este trabalho pretende-se fazer uma abordagem à quantificação da influência relativa das variáveis de entrada, tais como o grau de refinação e a percentagem de incorporação, na resistência do papel em estado seco e húmido.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Matéria-prima

Procedeu-se ao branqueamento laboratorial da fibra de Pinheiro Bravo nacional (*Pinus pinaster*). Para o efeito utilizou-se uma pasta comercial, gentilmente cedida pela Celtejo, sem secagem industrial e com um tratamento suave com oxigénio (índice kappa=25) que se sujeitou a uma sequência de dois estágios de dióxido de cloro com uma extracção intermédia, obtendo-se uma pasta com um valor de viscosidade de 830 ml/g. Utilizou-se pasta comercial de Eucalipto kraft branqueada proveniente de um só lote e pasta comercial de fibra longa kraft branqueada também proveniente de um só lote.

### Planeamento experimental

Na primeira fase, com vista a analisar o desempenho individual de cada matéria-prima, refinaram-se as pastas no PFI (1000, 3000 e 6000 rotações), determinando-se o °SR e o tempo de drenagem no formador laboratorial. Mediram-se as dimensões e a massa linear das fibras, utilizando o equipamento Morphi®. Produziram-se conjuntos de 14 folhas isotrópicas no formador laboratorial, prensaram-se, secaram-se e determinaram-se as propriedades estruturais e mecânicas em ambiente condicionado de acordo com as normas padrão. Na segunda fase, o objectivo consistiu em estudar o efeito da incorporação, tendo-se utilizado, na primeira abordagem, pastas de fibra curta e longa com o mesmo número de rotações no PFI; na terceira fase usaram-se pastas com níveis de refinação semelhantes, medidos como °SR. Os níveis de incorporação de fibra longa estudados foram de 10 e 20%. Na quarta fase testou-se o desempenho das folhas em estado húmido. Para o efeito produziram-se conjuntos de 10 folhas laboratoriais isotrópicas que se condicionaram com a humidade pós prensagem. Fazendo variar o teor de humidade, avaliou-se o seu comportamento reológico à tracção. Após cada ensaio em húmido determinou-se o teor de sólidos de cada provete testado.

## RESULTADOS

### Biometria

Na tabela 1 encontram-se os valores médios para o comprimento das fibras, largura e massa linear. Verifica-se que o Pinheiro Bravo nacional apresenta um comprimento médio 13.4% superior ao da fibra longa comercial e uma largura 15% superior. Contudo, a maior variação ocorre para a massa linear, com o Pinheiro Bravo nacional a apresentar um valor 45% superior ao da fibra longa comercial. Estes valores indicam que as fibras de Pinheiro Bravo nacional têm paredes mais espessas.

Tabela 1 – Principais dados morfológicos das pastas em estudo

	Fibra longa comercial	Pinheiro Bravo	Eucalipto
Comprimento médio pesado em comprimento (mm)	1.79	2.03	0.80
Largura (µm)	29.4	33.8	18.00
Massa linear (mg/m)	0.151	0.219	0.067

### Evolução das propriedades do Eucalipto e das fibras de reforço com a refinação

Nesta fase inicial do trabalho, refinaram-se as pastas no PFI e acompanhou-se a evolução do °SR, do tempo de drenagem e das propriedades das folhas laboratoriais. Na tabela 2 encontram-se os valores obtidos para a resistência à drenagem das diferentes pasta e para as propriedades estruturais e mecânicas das folhas laboratoriais isotrópicas das fibras em estudo: Eucalipto (Euc), fibra longa comercial (FL) e Pinheiro Bravo nacional (PB).

Tabela 2 – Valores médios de resistência à drenagem e propriedades das folhas do Eucalipto (Euc), da fibra longa comercial (FL) e do Pinheiro Bravo nacional (PB)

Matéria-prima	Euc	Euc	Euc	FL	FL	FL	PB	PB	PB	PB
Rotações no PFI	0	1000	3000	0	1000	3000	0	1000	3000	6000
°SR	21	27	47	15	20	28	13	14	22	53
Tempo de drenagem (s)	3.8	4.3	9.0	3.2	3.8	4.6	2.9	3.0	3.4	5.4
Massa volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	0.56	0.68	0.85	0.58	0.68	0.78	0.57	0.67	0.73	0.77
Permeabilidade ao ar Bendtsen (µm/Pa.s)	36.7	20.2	2.5	30.0	12.8	2.2	45.7	28.4	5.2	0.3
Índice de tracção (Nm/g)	19.0	47.2	74.5	19.1	54.6	75.4	26.8	48.8	75.6	84.0
Alongamento (%)	1.2	2.4	4.0	2.3	3.7	3.9	2.5	3.2	3.8	4.0
Índ. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	3.0	7.2	9.6	12.2	15.2	10.6	21.3	20.8	14.4	12.2
Lisura Bekk (s)	13	37	137	13	45	132	11	34	105	72

Ao fornecer energia mecânica à pasta com a refinação as fibras tornam-se mais flexíveis, a parede externa desenvolve fibrilação e ocorre produção de finos o que permite aumentar as ligações interfibras e aumentar a resistência do papel. No entanto com o decorrer da refinação aumentam também os efeitos indesejáveis, como por exemplo o corte das fibras e o aumento da resistência à drenagem. Assim a evolução das pastas com a refinação deve ser acompanhada da medição da resistência do papel, onde se verifica um impacto positivo, e da resistência à drenagem onde o impacto é negativo.

Para o presente estudo, um dos resultados mais relevantes da tabela 2 diz respeito ao rasgamento. Para um nível de refinação moderado (1000 rotações PFI), as fibras longas apresentam um desempenho muito superior ao do Eucalipto, evidenciando-se também diferenças significativas entre as fibras longas. O Pinheiro Bravo nacional apresenta um índice de rasgamento que é cerca de 2.9 vezes superior ao do Eucalipto, enquanto que a fibra longa comercial atinge as 2.1 vezes. Usando como referência o índice de tracção (75 N.m/g; 3000 rotações PFI), a pasta de fibra longa nacional continua a evidenciar melhor rasgamento do que a correspondente comercial. Este comportamento é consistente com o maior comprimento médio da fibra nacional. Apesar deste desempenho, a suspensão da fibra nacional drena mais facilmente. Para obter o mesmo °SR, a pasta nacional requer mais energia na refinação. Estas conclusões são naturalmente válidas para as pastas estudadas. É sabido que a matéria-prima nacional apresenta uma variabilidade considerável, em função da proveniência, o que afecta as características morfológicas médias das fibras. Outro aspecto digno de nota é a relação entre a resistência à drenagem e a permeabilidade ao ar das estruturas de fibras curta e longa comerciais. Para a mesma densidade de estrutura (0.68 g/cm<sup>3</sup>) e, portanto, para a mesma porosidade global, a fibra longa comercial apresenta muito menor permeabilidade ao ar que a correspondente estrutura de fibra curta, colocando em evidência o papel da morfologia das fibras e a sua influência sobre a tortuosidade da estrutura. Os resultados experimentais são perfeitamente compatíveis com a elevada colapsibilidade das fibras comerciais Nórdicas e a baixa colapsibilidade das fibras de eucalipto, mas elevada capacidade de empacotamento. A 3000 rotações, a permeabilidade ao ar das duas estruturas é semelhante, apesar da estrutura de fibra curta apresentar muitíssimo maior resistência à drenagem.

#### **Incorporação de fibra longa comercial com o mesmo número de rotações no PFI**

Para estudar o efeito da incorporação de fibras longas no papel de Eucalipto, começou por efectuar-se um conjunto de experiências em que as pastas de Eucalipto (Euc) se misturam com pastas de fibra longa comercial (FL) refinadas com o mesmo número de rotações no PFI, usando uma proporção de 90% de Eucalipto e 10% de fibra longa. Na tabela 3 incluíram-se também os valores das pastas 100% Eucalipto e 100% fibra longa comercial para efeito de comparação.

Tabela 3 – Resistência à drenagem e propriedades das folhas laboratoriais de pastas de Eucalipto com 10% de incorporação de fibra longa comercial (FL)

Matéria-prima	100% Euc	100% FL	90%Euc 1000 10%FL 1000	100%Euc 3000	100%FL 3000	90%Euc 3000 10%FL 3000	90%Euc 6000 10%FL 6000
Rotações no PFI	1000	1000					
°SR	27	20	27	47	28	47	85
T. drenagem (s)	4.3	3.8	5.0	9.0	4.6	9.0	65.0
M. volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	0.68	0.68	0.69	0.85	0.78	0.79	0.91
Perm. Bendtsen (µm/Pa.s)	20.2	12.8	19.0	2.5	2.2	1.5	0.03
Í. tracção (Nm/g)	47.2	54.6	48.0	74.5	75.4	78.4	80.5
Alongamento (%)	2.4	3.7	2.6	4.0	3.9	4.3	4.7
Í. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	7.1	15.2	9.2	9.5	10.6	9.3	9.1
Lisura Bekk (s)	37	45	34	137	132	131	285

Pode verificar-se que o Eucalipto refina e densifica muito mais rapidamente que a fibra longa comercial, apresentando um valor de °SR 68% superior ao da fibra longa para as 3000 rotações em PFI, o que sugere um desenvolvimento muito significativo da fibrilação externa. A maior resistência à drenagem do Eucalipto, para o mesmo número de rotações, está também fortemente determinada para maior capacidade de empacotamento das fibras curtas. Com o aumento da refinação a diferença entre o Eucalipto e a fibra longa acentua-se. Enquanto que a 1000 rotações, a pasta de Eucalipto apresenta uma resistência à drenagem que é 35% superior à da fibra longa, para 3000 rotações a diferença é de 68%, como se referiu anteriormente. A pasta de mistura drena com as mesmas características do Eucalipto, não se observando uma influência significativa da adição da fibra longa no valor do grau Schopper Riegler nem no tempo de drenagem. Para 1000 rotações, verifica-se que as folhas de fibra longa são mais resistentes e a sua incorporação a uma taxa de 10% faz aumentar a resistência das folhas de Eucalipto em 2% para a tracção e 33% para o rasgamento. Para 1000 rotações obtêm-se folhas com a mesma massa volúmica para as fibras longa e curta e ligeiramente superior para a mistura, o que pode indicar algum efeito de empacotamento. Nas 3000 rotações, a incorporação de fibra longa diminui muito significativamente a densidade da estrutura fibrosa; i.e. melhora o volume mássico do papel à base de Eucalipto. Ainda assim, verifica-se um efeito sinérgico positivo na resistência à tracção e no alongamento. Pelo contrário, o rasgamento vê-se ligeiramente prejudicado. Para as 3000 rotações a lisura da mistura não se viu significativamente afectada, tendo diminuído ligeiramente para a refinação com 1000 rotações. A permeabilidade ao ar diminui com a incorporação de fibra longa comercial.

#### **Incorporação de fibra longa comercial e Pinheiro Bravo nacional com o mesmo nível de refinação**

Nesta secção e na seguinte faz-se o estudo comparativo da incorporação das duas fibras de reforço objecto do estudo. Para este efeito, escolheu-se como pasta de base a pasta de Eucalipto refinada a 1000 rotações no PFI (27°SR) e incorporou-se pasta de fibra longa comercial com 3000 rotações (28°SR) ou pasta de Pinheiro Bravo Nacional com 3000 rotações (22°SR) ou ainda pasta nacional com 6000 rotações no PFI (53°SR). Testaram-se dois níveis de incorporação, 10 e 20%, tendo-se verificado que a resistência à drenagem é semelhante para todas as suspensões. Os resultados obtidos constam da tabela 4. No que diz respeito ao efeito da incorporação sobre a densidade da estrutura, verifica-se uma densificação da estrutura para ambas as pastas de reforço. A fibra nacional conduz, no entanto, a estruturas fibrosas mais permeáveis ao ar, em consonância com os dados da tabela 2 (FL 3000 e PB 3000).

Tabela 4 – Resistência à drenagem e propriedades das folhas laboratoriais de pastas de Eucalipto (Euc), com 10% e 20% de incorporação de fibra longa comercial (FL) e Pinheiro Bravo nacional (PB)

Matéria-prima	Euc	90%Euc	80%Euc	90%Euc	80%Euc	90%Euc	80%Euc
Rotações no PFI	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
		10%FL	20%FL	10%PB	20%PB	10%PB	20%PB
		3000	3000	3000	3000	6000	6000
°SR	27	27	28	27	28	29	32
T. drenagem (s)	4.3	4.6	4.8	4.4	4.4	4.6	4.9
M. volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	0.68	0.72	0.73	0.71	0.73	0.73	0.73
Perm. Bendtsen (µm/Pa.s)	20.2	12.2	6.7	17.4	8.3	7.9	5.0
Í. tracção (Nm/g)	47.2	55.0	56.5	54.0	57.0	56.8	60.6
Alongamento (%)	2.4	3.2	3.9	3.0	3.1	3.3	3.5
Í. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	7.16	9.36	9.71	9.68	10.20	9.16	10.73
Lisura Bekk (s)	137	52	56	43	60	56	59

Na tabela 5 quantifica-se o efeito da incorporação das fibras de reforço nas propriedades mais relevantes do papel. Em primeiro lugar, é de realçar o impacto muito significativo das fibras de reforço na resistência à tracção, no alongamento e na resistência ao rasgamento. Verifica-se que o maior aumento na resistência à tracção (28%) e rasgamento (50%) ocorre com a incorporação de 20% de Pinheiro Bravo fortemente refinado e o maior aumento de alongamento (62.%) para a fibra longa comercial também a 20% de incorporação. Para níveis de refinação comparáveis, e considerando globalmente as propriedades relevantes, não há diferenças significativas entre as duas fibras de reforço objecto deste estudo. Os resultados da Tabela 5 mostram, ainda, que a resposta não é directamente proporcional ao teor de fibras longas.

Tabela 5 – Percentagem de variação das propriedades de resistência do papel de Eucalipto reforçado, relativamente ao não reforçado

Varição em relação a Euc 1000 (%)	90%Euc	80%Euc	90%Euc	80%Euc	90%Euc	80%Euc
	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	10%FL	20%FL	10%PB	20%PB	10%PB	20%PB
	3000	3000	3000	3000	6000	6000
Í. tracção (Nm/g)	16.5	19.7	14.4	20.8	20.3	28.4
Alongamento (%)	32.1	62.5	25.0	29.2	37.5	45.8
Í. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	30.7	35.6	35.2	42.45	27.9	49.9

Na tabela 6 quantifica-se o efeito do nível de refinação do Eucalipto e da fibra de reforço e ainda o da percentagem de incorporação. O aumento do nível de refinação do Eucalipto de 1000 para 3000 rotações no PFI é o factor que mais faz variar a resistência à tracção e tem um efeito muito significativo sobre o rasgamento, embora à custa de um aumento impraticável da resistência à drenagem. Para as misturas de pastas, verifica-se que para as pastas reforçadas com fibra longa comercial, o aumento do nível de refinação desta pasta de 1000 para 3000 é o factor com maior percentagem de variação da resistência à tracção (14,6%), enquanto que a mudança de percentagem de incorporação de 10 para 20% apenas faz aumentar essa resistên-

cia em 2,7%. Quando a fibra de reforço é o Pinheiro Bravo nacional, tanto a refinação como a percentagem de incorporação contribuem para o aumento da resistência à tracção com valores próximos, entre os 5 e os 7%.

Tabela 6 – Efeito da refinação do Eucalipto, da refinação da fibra de reforço e da percentagem de incorporação na variação da drenagem e das propriedades de resistência do papel em estado seco

Factores	Refinação do Eucalipto	Refinação da Fibra Longa (10% inc.)	Incorp. Fibra Longa 3000	Refinação Pinheiro Nacional (10% inc.)	Refinação Pinheiro Nacional (20%inc.)	Incorp. Pinheiro Nacional 3000	Incorp. Pinheiro Nacional 6000
Situação de referência	Euc 1000	90%Euc 1000 10%FL 1000	90%Euc 1000 10%FL 3000	90%Euc 1000 10%PB 3000	80%Euc 1000 20%PB 3000	90%Euc 1000 10%PB 3000	90%Euc 1000 10%PB 6000
Situação final	Euc 3000	90%Euc 1000 10%FL 3000	80%Euc 1000 20%FL 3000	90%Euc 1000 10%PB 6000	80%Euc 1000 20%PB 6000	80%Euc 1000 20%PB 3000	80%Euc 1000 20%PB 6000
	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)	Variações (%)
°SR	74.0	0	3.7	9.4	14.3	5.7	1.03
T. drenagem (s)	1.2	7.7	3.0	2.9	11.1	0	7.9
M. volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	25	4.3	1.4	2.8	0	2.8	0
Perm. Bendtsen (µm/Pa.s)	-87.6	-35.8	-49.9	-54.6	-39.3	-52.4	-36.4
Índice tracção (Nm/g)	57.8	14.6	2.7	5.2	6.3	5.6	6.7
Alongamento (%)	66.7	21.9	23.0	3.3	12.9	3.3	6
Índ. rasgamento (mN.m <sup>2</sup> /g)	33.3	-1.6	3.7	-5.4	5.2	-5.4	17.4
Lisura Bekk (s)	270	52.9	7.6	30.2	-1.7	30.2	5.3

### Resistência em húmido

Considerando que uma das áreas críticas para as quebras é a secção de prensas, onde o teor de sólidos pode variar entre 30 e 50%, analisou-se o desempenho das folhas em estado húmido. Nas figuras 1 e 2 representa-se o valor da energia absorvida por um provete de 25mm até ao ponto de ruptura, quando traccionado a uma velocidade de 10mm/min, para diferentes teores de sólidos dos provetes.

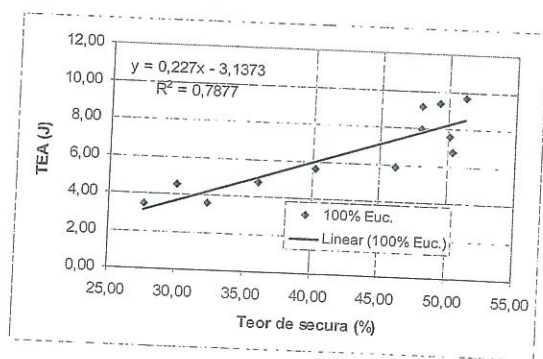


Figure 1 – TEA vs teor de sólidos, para o Eucalipto

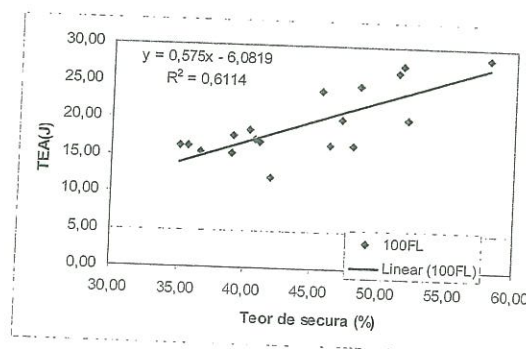


Figure 2 – TEA vs teor de sólidos, para a fibra longa comercial

Para um intervalo de teor de sólidos de 40 a 45%, o Eucalipto apresenta um TEA (Tensile Energy Absorption) de 6 a 7J, o Pinheiro Bravo de 17 a 21 J e a fibra longa comercial de 16 a 20 J. Estes dados experimentais evidenciam, desde logo, a grande debilidade das estruturas fibrosas húmidas de Eucalipto face às correspondentes estruturas de fibras longas.

Nas pastas com incorporação utilizou-se Eucalipto refinado a 1000 rotações com 27 °SR, fibra longa comercial refinada a 3000 rotações com 28 °SR e Pinheiro Bravo nacional refinado a 4000 rotações com 25 °SR. Testaram-se dois níveis de incorporação, podendo concluir-se que no intervalo de teor de sólidos de 40 a 45% o Eucalipto reforçado com 20% de Pinheiro Bravo apresenta um TEA de 9.5 a 12 J e reforçado com fibra longa comercial de 10 a 11.5 J (Figuras 3 e 4). Para 90% de incorporação e mesma gama de teor de sólidos obtém-se um TEA de 8 a 9.5 J para o Pinheiro Bravo e 8 a 9 J para a fibra longa comercial.

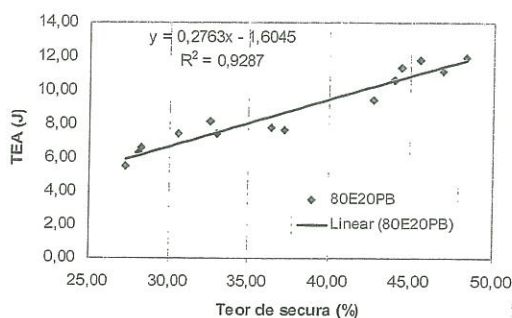


Figure 3 – TEA vs teor de sólidos, para 20% de Pinheiro Bravo

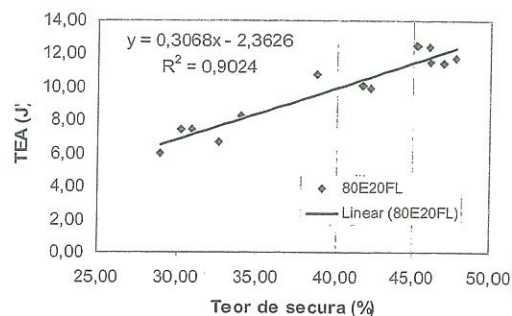


Figure 4 – TEA vs teor de sólidos, para 20% de fibra longa comercial

## CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu confirmar que as fibras de pinho nacional são ligeiramente mais compridas e apresentam maior massa linear do que a generalidade das fibras de *softwood* comerciais. Estas características morfológicas fazem com que o aumento da resistência à drenagem, tradicionalmente usada como uma medida da refinação, seja mais lento para a fibra nacional. O efeito da incorporação de fibra longa sobre a densidade da estrutura fibrosa mista e das suas propriedades em estado seco dependem dos níveis de refinação das pasta de fibra curta e longa. Porém para um nível de refinação da fibra curta de 27°SR, a incorporação tem sempre um efeito muito positivo sobre as resistências à tracção e ao rasgamento, bem como sobre o alongamento à ruptura. O estudo do comportamento à tracção do papel na gama de teor de sólidos entre 30 e 50% mostrou o impacto muito positivo da incorporação sobre a energia absorvida pelo material até sofrer ruptura. Além disso, não se observaram diferenças significativas entre as duas fibras de reforço objecto do estudo: uma fibra de reforço comercial e o pinho nacional branqueado em laboratório.

## BIBLIOGRAFIA

- Mohlin, U-B., Wennberg, K., *Tappi J.* 67, 1984, 1, 90-93.  
 Moilanen, P., Linqvist, U., *Tappi J.* 79, 1996, 9, 88-94.  
 Niskanen, K., Kajanto, I., Pakarinen, P., Paper structure. Paper Physics. Ed. K. Niskanen, Finnish Paper Engineers' Ass. TAPPI, Jyväskylä, Finland, 1998. 14-53.  
 Page, D.H., Seth, R.S., *Tappi J.* 65, 1982, 8, 92-95.  
 Parsons, S.R., *Tappi J.* 52, 1969, 7, 1262-1266.  
 Retulainen, E., D.Sc. (Tech) thesis. HUT, Lab. of Paper Technology, Reports, Series, A 7. Espoo, Finland, 1997.  
 Roisum, D.R., *Tappi J.* 73, 1990, 2, 101-106.  
 Sears, G.R., Tyler, R.F., Denzer, C.W., *Pulp and Paper Magazine of Canada* 66, 1965, 7, T351-T360.  
 Uesaka, T., Ferahi, M., Hristopulos, D., Deng, N., Moss, C., *The Science of Papermaking*, Transactions of the 12<sup>th</sup>, FRS, Oxford, England, 2001.  
 Van den Akker, J.A., Wink, W.A., Van Eperen, R.H., Instrumentation studies LXXXIX, *Tappi* 50, 1967, 9, p. 466-470.

## ***Anexo XIV***

---

D. Gonçalves, C. Gil, A. P. Duarte, M. E. Amaral (2007). Influência do tratamento enzimático na biorefinação de uma pasta de Pinus pinaster ao sulfato não branqueada, in Engenharias'07- Inovação & Desenvolvimento, Covilhã, 21-23 novembro 2007, Covilhã, Portugal.

## Influência do tratamento enzimático na biorefinação de uma pasta de *Pinus pinaster* ao sulfato não branqueada

Donzília Gonçalves<sup>2</sup>, Cristina Gil<sup>1,2</sup>, Ana Paula Duarte<sup>1,2</sup> e Maria Emília Amaral<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Investigação de Materiais Têxteis e Papeleiros, <sup>2</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel  
Universidade da Beira Interior, 6200-001 Covilhã  
E-mail de contacto: mcamaral@ubi.pt

**Resumo** - Uma pasta de *Pinus pinaster* ao sulfato não branqueada foi tratada enzimaticamente antes de ser submetida à refinação. Usaram-se dois tipos de enzimas, uma mistura comercial de celulases com diferentes dosagens (0UI; 1UI; 2UI e 4UI) e uma xilanase purificada com dosagens de (0UI; 1UI e 2UI) respectivamente. O efeito destes tratamentos sobre a refinabilidade das pastas foi avaliado em termos de grau Schopper-Riegler (°SR) e de índice de hidratação das fibras (WRV). As características biométricas das fibras foram analisadas e os resultados respeitantes ao comprimento médio ponderado em comprimento mostraram que a degradação não é significativa para o caso das pastas tratadas com celulases. As propriedades de resistência das pastas não foram expressivamente afectadas com a aplicação da enzima. Analisando por exemplo, a variação do índice de tracção com as diferentes dosagens de celulases, sem refinação (0 revoluções PFI), observa-se um incremento desta propriedade de 77%, mostrando a ocorrência de fibrilação ao nível das fibras e portanto, a capacidade de biorefinação da enzima. No caso da xilanase e para as mesmas condições não há mais uma vez qualquer incremento.

### 1. Introdução

O uso de enzimas na indústria de pasta e papel sofreu um grande desenvolvimento nas duas últimas décadas. As enzimas celulolíticas têm sido intensivamente investigadas e usadas em várias aplicações, embora muitas áreas ainda estejam em desenvolvimento. De facto, estas enzimas modificam as propriedades interfaciais das fibras, aumentando a afinidade para a água, o que por sua vez provoca alterações nas propriedades técnicas da pasta e do papel, como a drenabilidade e a resistência [1-3]. A destintagem de fibras secundárias tem sido outra utilização para estas enzimas [4].

A influência destas enzimas nas fibras de espécies de madeira Portuguesas foi estudada pelo nosso grupo de trabalho [5-7] e os resultados obtidos mostraram que celulases e hemicelulases comerciais influenciavam as propriedades papeleiras das pastas kraft cruas de *Eucalyptus globulus* e de *Pinus pinaster*. Este grupo de trabalho mostrou ainda que o tratamento das fibras de pastas kraft cruas de *Pinus pinaster* com xilanases comerciais dava origem a um aumento na sua flexibilidade com a consequente melhoria na capacidade de ligação inter fibras [8].

O uso de xilanases como activadores de branqueamento tem sido também uma aplicação biotecnológica na indústria de pasta e papel [9-11]. O tratamento de fibras provenientes de diversas origens com diferentes celulases e hemicelulases comerciais resulta na redução do consumo energético durante a refinação. Esta economia é

conseguida por redução do tempo de refinação para atingir os mesmos níveis de refinação, sem afectar as propriedades de resistência da pasta [12]. Resultados semelhantes foram encontrados para a xilanase purificada obtida a partir do fungo *Trichoderma reesei* [13]. Estes resultados são mais notórios quando os tratamentos são efectuados em pastas secas em vez de pastas nunca secas [14] e os melhores resultados foram encontrados com celulases purificadas em vez de misturas [15,16]. O consumo de energia na indústria de pasta e papel é elevado, contribuindo em cerca de 18% do custo de produção. Para o desenvolvimento das propriedades pretendidas, uma pasta tem de ser sujeita ao processo de refinação, representando este 18% do total de energia eléctrica requerida para produzir papel [12]. Devido à escassez em energia disponível e ao elevado custo energético, a conservação de energia tornou-se uma necessidade para a indústria papeleira. Consequentemente, qualquer tratamento à pasta que implique uma diminuição no consumo em energia, nomeadamente no que diz respeito à operação de refinação, terá um efeito benéfico no consumo global de energia na indústria.

Neste trabalho avaliou-se o resultado do tratamento de uma pasta kraft crua de *Pinus pinaster* com uma mistura comercial de celulases e uma xilanase purificada a partir do fungo *Humicola grisea*. O efeito destas enzimas na biorefinação foi avaliado para diferentes dosagens em termos de propriedades de drenabilidade, morfológicas e das propriedades da pasta para papel.

### 2. Material e métodos

#### A. Materiais

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi uma pasta kraft crua de *Pinus pinaster* industrial.

A mistura de celulases, designada comercialmente por Celluclast (Novo Nordisk) foi produzida a partir de uma estirpe seleccionada do fungo *Trichoderma reesei*. A xilanase foi produzida em laboratório a partir do fungo *Humicola grisea* e apresentava-se em pó pelo que foi necessário solubilizá-la, utilizando solução tampão de citrato de pH = 4,8.

#### B. Tratamento enzimático

A pasta foi tratada com 1, 2 e 4 mg de celulases/g pasta, e 1 e 2 UI xilanase/g pasta. O tratamento foi realizado em sacos de plástico nas seguintes condições: 5% de consistência, temperatura de 50 °C e tempo de reacção de 1 hora (agitação manual de 10 em 10 minutos). O pH da

suspensão foi ajustado para pH = 5 para as celulasas e pH = 6,5 para a xilanase, usando uma solução diluída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e de NaOH. A reacção foi interrompida por lavagem da pasta com água desionizada até pH neutro. A pasta de controlo foi tratada em paralelo e de modo semelhante, sem adição de enzima.

C. Caracterização da pasta

As amostras de pasta foram refinadas no refinador PFI com uma consistência de 10% e uma intensidade de refinação de 3,33 N/mm. Estas pastas foram caracterizadas posteriormente determinando-se o grau Schopper-Riegler (°SR), de acordo com a norma ISO 5267/1 e o grau de retenção de água (WRV) de acordo com o método referido por Silvy e colaboradores [17]. Para a determinação das propriedades biométricas utilizou-se o MORFI®, aparelho baseado em análise de imagem de uma suspensão diluída que passa numa câmara de fluxo.

As folhas foram preparadas de acordo com a norma ISO 5269/1. As propriedades físico-mecânicas e estruturais das folhas foram medidas de acordo com as respectivas normas ISO.

3. Resultados e Discussão

A. Efeito do tratamento enzimático na refinação

O comportamento da pasta face à refinação, em termos de índice de drenagem, é melhorado pelo pré-tratamento enzimático no caso das enzimas celulolíticas (celulasas), não se observando qualquer tipo de alteração para o caso da adição de enzimas hemicelulolíticas (xilanases), como se pode observar na Figura 1. Os resultados obtidos para a mistura de celulasas mostram aumentos de °SR de cerca de 71% para a dose de 4,0 mg/g de pasta para a mesma energia de refinação (3000 revoluções PFI). A hidratação da fibra durante a refinação, medida pelo WRV (*water retention value*), segue a tendência do grau Schopper-Riegler. O efeito da adição de enzimas é evidente apenas quando se adiciona celulasas, provavelmente porque estas enzimas degradam mais a parede celular, dando origem a uma maior superfície exposta susceptível de estabelecer ligações com as moléculas de água e assim contribuir para uma maior hidratação.

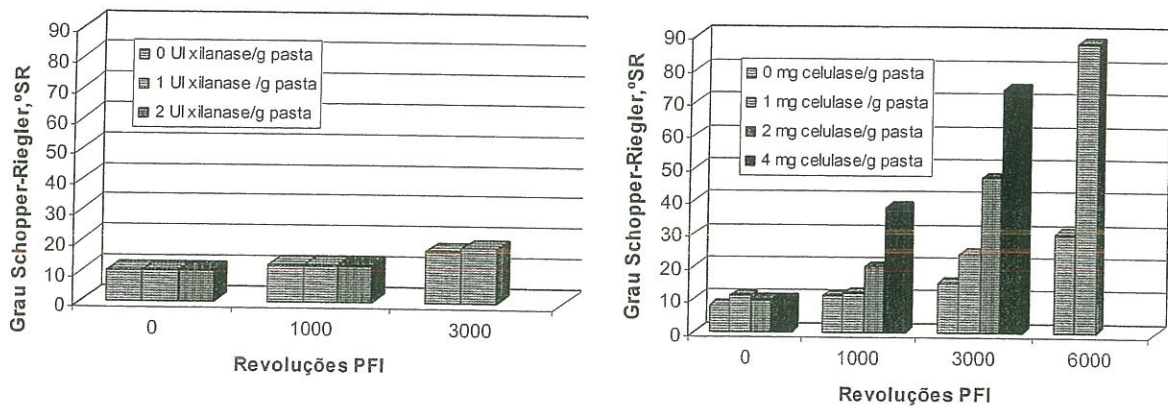


Figura 1. Evolução do grau Schopper-Riegler (°SR) com a refinação para as pastas tratadas com xilanase e com celulasas.

As características biométricas da pasta tratada com celulasas são apresentadas na Tabela I. O comprimento da fibra apresenta-se como uma das propriedades mais

afectadas, mostrando uma diminuição de 22% apenas com a adição de enzimas, evidenciando o efeito da biorefinação.

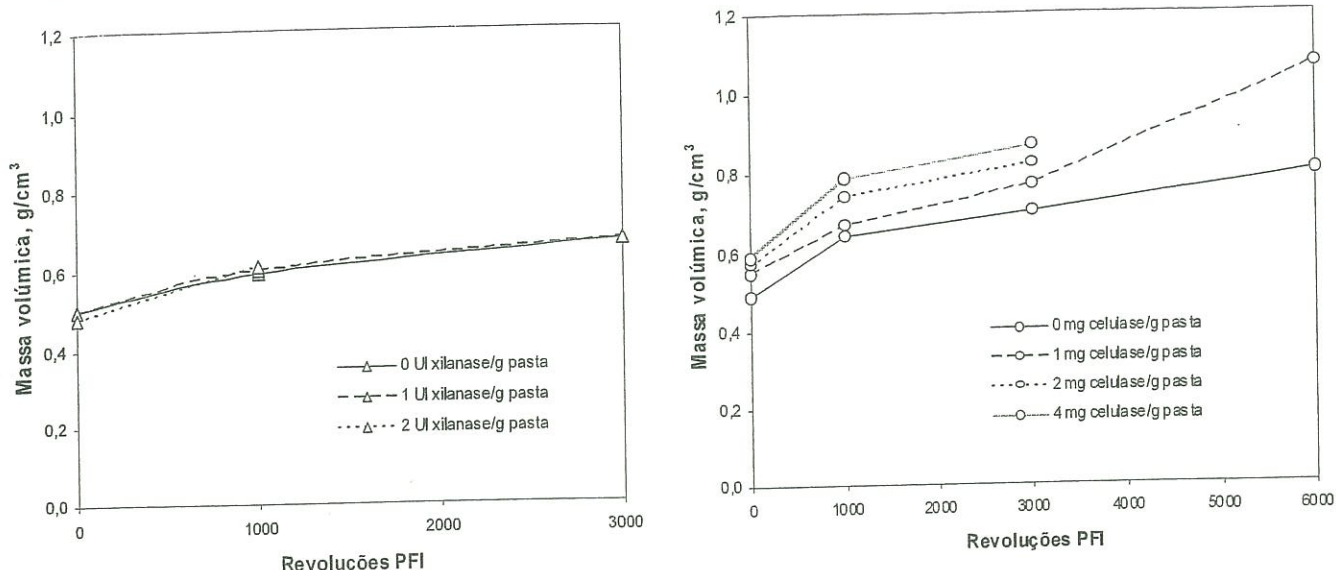
Tabela I Caracterização biométrica da pasta com a refinação e as diferentes dosagens de enzimas.

Refinação PFI	0 mg celulasas/g pasta				1 mg celulasas/g pasta				2 mg celulasas/g pasta			4 mg celulasas/g pasta		
	0	1000	3000	6000	0	1000	3000	6000	0	1000	3000	0	1000	3000
Largura das Fibras, mm	32,1	33,8	33,4	33,7	31,9	34,4	35,6	39,0	31,6	37,4	37,5	31,9	38,7	38,4
Comprimento das fibras, mm	1,918	2,082	1,975	1,876	1,865	1,867	1,638	0,684	1,783	1,064	1,207	1,484	0,790	0,949
Massa linear mg/m	0,305	0,172	0,227	0,229	0,393	0,196	0,173	0,207	0,406	0,244	0,194	0,245	0,248	0,222
Curvatura, %	9,8	9,3	9,1	9,7	10,3	9,4	8,3	8,4	10,2	7,6	7,6	10,7	7,3	7,8

*B. Efeito do tratamento enzimático nas propriedades da pasta*

A massa volúmica das folhas (Figura 2), a qual pode ser considerada como uma indicação da conformabilidade das fibras, reflectindo o seu potencial de ligação, para o caso do tratamento com xilanase verifica-se um aumento de 3%,

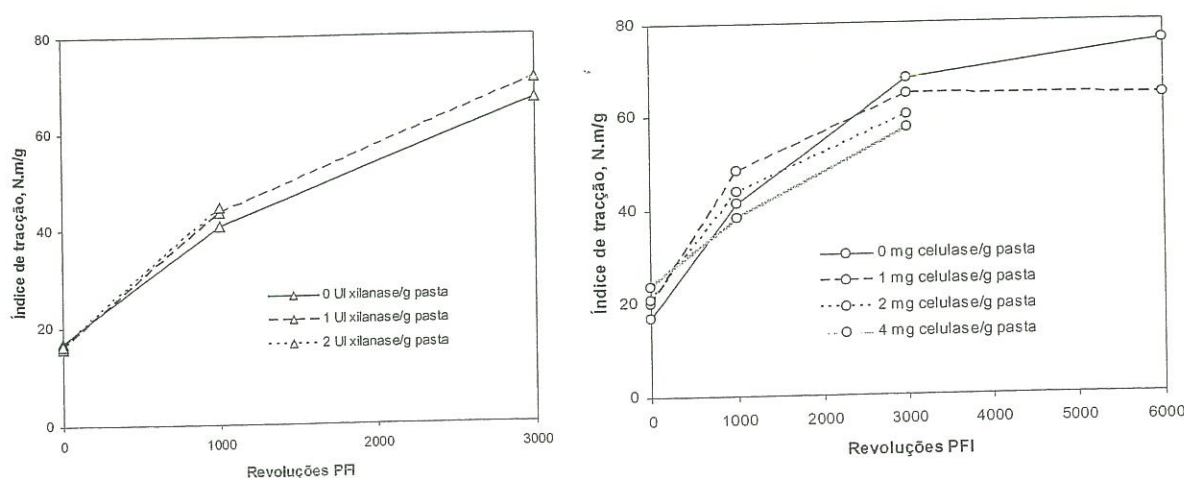
enquanto que as pastas tratadas com celulasas apresentam um aumento de 19% desta propriedade para a dose mais elevada e o mesmo nível de refinação intermédio (1000 revoluções PFI).



**Figura 2.** Evolução da massa volúmica com a refinação para as pastas tratadas com xilanase e com celulasas.

Como se pode observar nos gráficos da Figura 3, existe um aumento de 19% nas pastas tratadas com xilanase e para 1000 revoluções PFI. Para os tratamentos enzimáticos com celulasas, a resistência à tracção é aumentada 29% somente com a adição de enzima e sem refinação, mostrando muito provavelmente que houve fibrilação externa nas fibras. O efeito da refinação com as diferentes dosagens de enzima

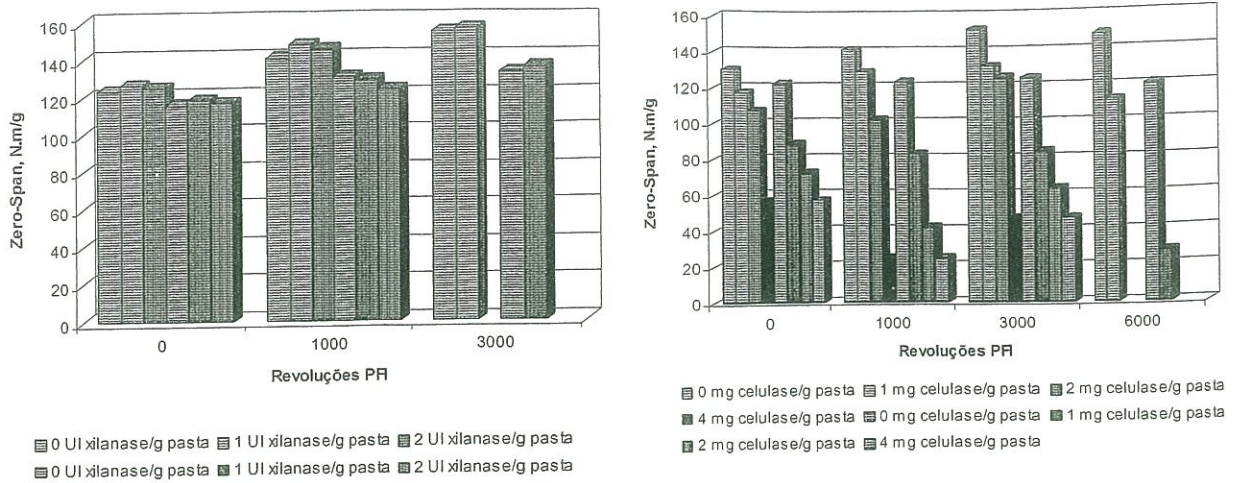
mostra um incremento para as 1000 revoluções PFI, mas para as 3000 revoluções verifica-se uma diminuição de 16% nesta propriedade, para a máxima dosagem de enzima. Este comportamento evidencia a ocorrência de uma ligeira degradação das fibras quer no seu comprimento, quer na sua resistência intrínseca, como se confirma pela análise da característica que se segue.



**Figura 3.** Evolução da resistência à tracção com a refinação para as pastas tratadas com xilanase e com celulasas.

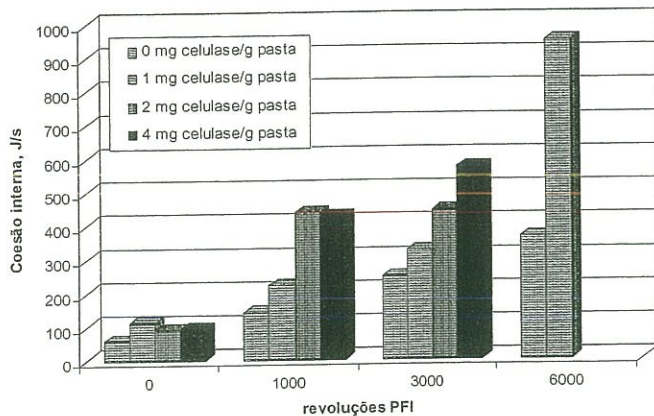
A acção das celulasas e da xilanase sobre as fibras pode dar origem à sua degradação, por hidrólise dos seus constituintes polissacarídicos. Esta degradação das fibras de celulose pode ser avaliada através da determinação da sua resistência intrínseca pelo método Zero-Span. Os

resultados da figura 4 mostram que as pastas tratadas com as diferentes doses de celulasas apresentam uma maior degradação do que as tratadas com xilanase para os diferentes graus de refinação.



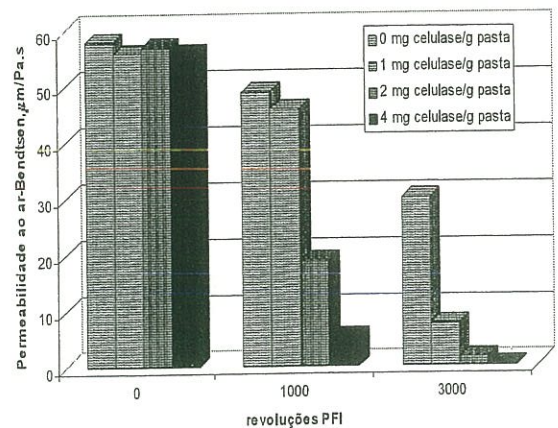
**Figura 4** Evolução da resistência intrínseca da fibra com a refinação para as pastas tratadas com xilanase e com celulasas. (As barras a cheio representam o zero-span determinado em seco e as barras a quadriculado representam o ensaio em húmido)

A figura 5 mostra que a coesão interna é melhorada em 15% para a pasta tratada com celulasas e sem refinação, e para a pasta refinada ocorrem incrementos mais significativos, justificados pelo aumento da fibrilação externa na fibra.



**Figura 5** Evolução da coesão interna com a refinação para as pastas tratadas com celulasas.

O efeito da adição de enzimas na permeabilidade ao ar (figura 6) mostra que um incremento na dosagem de enzima torna as folhas menos permeáveis, este efeito é tanto mais visível quanto o nível de refinação é aumentado. Estes resultados estão de acordo com os observados para a massa volúmica das folhas.



**Figura 6** Evolução da permeabilidade ao ar Bendtsen com a refinação para as pastas tratadas com celulasas.

#### 4. Conclusões

Este trabalho mostrou que a acção de um tratamento enzimático antes da refinação aumenta o índice de drenagem da pasta e o grau de hidratação das fibras, sendo este efeito mais visível no caso da adição de celulasas. Este comportamento permite adiantar que será possível a redução do tempo de refinação para atingir os mesmos níveis de refinação, com a consequente economia no consumo energético deste processo mecânico. Para o caso das celulasas, o efeito da sua adição sobre as propriedades da pasta, conduz a alguma degradação das fibras, e paralelamente ocorre alguma fibrilação externa que se

traduz na variabilidade de comportamento nas propriedades de resistência, no entanto, genericamente isto não pode ser considerado nefasto para estas propriedades. Para as pastas tratadas com xilanase é apresentando mesmo um ligeiro aumento para as propriedades estudadas. Estes resultados mostram que a biotecnologia pode contribuir de forma positiva para a indústria de pasta e papel. O trabalho aqui apresentado resulta da investigação feita no âmbito da cadeira de projecto de investigação do curso de Engenharia Química.

**Agradecimentos** Os autores agradecem a cedência da enzima xilanase de *Hemicella grisea* pela Doutora Fabrícia Paula de Faria da Universidade Federal de Goiás do Brasil.

### Referências

- [1] Pala, H., Mota, M., Gama, F.M., "Enzymatic modification of paper fibres", *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(5): 353-361, 2002.
- [2] Oksanen, T., Pere, J., Paavilainen, L., Buchert, J., Viikari, L., "Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases", *Journal of Biotechnology*, 78, 39-48, 2000.
- [3] Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., "Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases*", *Industrial Crops and Products*, 20, 11-21, 2004.
- [4] Pèlach, M.A., Pastor, F. J., Puig, J., Vilseca, F., Mutjé, P., "Enzymic deinking of old newspapers with cellulose", *Process Biochemistry*, 38(7), 1063-1067, 2003.
- [5] Spiridon, I., Belgacem, M.N., Duarte, A.P., "The behaviour of two main portuguese wood species towards enzymatic hydrolysis", *Cell. Chem. Technol.*, 35(3-4), 243-251, 2001.
- [6] Spiridon, I., Duarte, A.P., Belgacem, M.N., "Enzymatic hydrolysis of *Pinus pinaster* kraft pulp", *Appita Journal*, 54(5), 457-459, 2001.
- [7] Spiridon, I., Duarte, A.P., "Some preliminary data on the enzymatic hydrolysis of *Pinus pinaster* kraft pulp", *Cell. Chem. Technol.*, 38(1-2), 59-65, 2004.
- [8] Spiridon, I., Duarte, A.P., Curto, J., "Influence of xylanase treatment on *Pinus pinaster* kraft pulp", *Cell. Chem. Technol.*, 37(5-6), 497-504, 2003.
- [9] Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T., "Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of Eucalyptus pulp", *Process Biochemistry*, 36, 45-50, 2000.
- [10] Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T., "The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps", *Bioresource Technology*, 96, 21-30, 2005.
- [11] Shah, A.K., Cooper, D., Adolphson, R., Eriksson, K.-E.L., "Xylanase treatment of oxygen-bleached hardwood kraft pulp at high temperature and alkaline pH levels gives substantial savings in bleaching chemicals", *Journal of Pulp and Paper Science*, 26(1): 8-11, 2000.
- [12] Bhardwaj, N.K., Bajpai, P., Bajpai, P.K., "Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability", *Journal of Biotechnology*, 51, 21-26, 1996.
- [13] Wong, K.K.Y., Kibblewhite, R.P., Signal, F.A., "Effect of xylanase and dosage on the refining properties of unbleached softwood kraft pulp", *J. Wood Chemistry and Technology*, 19(3), 205-212, 1999.
- [14] García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Díaz, P., Vidal, T., "Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp", *Cellulose*, 9, 115-125, 2002.
- [15] Pere, J., Siika-aho, M., Buchert, J., Viikari, L., "Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp", *Tappi J.*, 78(6), 71-78, 1995.
- [16] Pere, J., Siika-aho, M., Viikari, L., "Biomechanical pulping with enzymes: response of coarse mechanical pulp to enzymatic modification and secondary refining", *Tappi Journal*, 83(5), 1-8, 2000.
- [17] Silvy, J., Romatier, G., Chiodi, R., Méthodes pratiques de contrôle du raffinage, *Revue A.T.I.P.*, 22, 31-53, 1968.

## ***Anexo XV***

---

D. Andrade, C. Gil, F.C. Domingues, L. Breitenfeld, A. P. Duarte (2008). *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. as sources of bioactive compounds, Livro de resumos do XVI Congresso Nacional de Bioquímica, P08, 22-26 novembro 2008, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, Portugal.

**S12 P8** *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. as sources of bioactive compounds

Andrade, D.<sup>1</sup>, Gil, C.<sup>2</sup>, Domingues, F.<sup>2,3</sup>, Breitenfeld, L.<sup>3</sup> and Duarte, A.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Undergraduate student of Chemical Engineering; <sup>2</sup>Research Unit of Textile and Paper Materials; <sup>3</sup>Health Sciences Research Centre University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

The forest area in Portugal covers around 38% of the territory and represents a large quantity of forestry residues, where one can include the shrub species. These plants can be used as raw material for achieving high value chemicals, like bioactive compounds. This work is a part of a project that intends to produce ethanol from this lignocellulosic biomass, according to the biorefinery concept.

The present work, deals with the characterisation of ethanol and acetone extracts of *Cistus ladanifer* (rock-rose) and *Arbutus unedo* L. (strawberry tree), which are characteristic shrub species of the Mediterranean region. The whole plants (stalks and leaves) were milled in a cutting mill and the resulting material was extracted with ethanol and acetone/water solutions, giving yields ranging 8.5 to 20.6%. The extracts were characterised concerning the total phenolic and flavonoids contents, presenting relatively high values when compared with other species described in literature. The anti-oxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method in terms of EC<sub>50</sub>, using trolox and gallic acid as standard references. The extracts of both species showed scavenging activity for the DPPH radical.

Extracts bioactivities were also tested by the evaluation of the viability effects on human fibroblasts primary culture cells. Viability studies were performed by MTT method. Both extracts are bioactive; *Cistus ladanifer* extracts are associated with an inhibitory effect and *Arbutus unedo* L. are associated with an induced effect on cells viability.

## *Anexo XVI*

---

P. Baptista, C. Gil, M.E. Amaral, F.C Domingues, A.P. Duarte (2008). Antioxidant activity of forest residues extracts. *Revista Portuguesa de Farmácia*, Vol. LII, nº3 (suplemento), 1º Encontro Nacional de Química Terapêutica, 62, 13-15 novembro, Porto, Portugal

## Influence of extraction conditions on flavonoid yields from different Portuguese forest residues

Patrícia Baptista<sup>1</sup>, Cristina Gil<sup>2</sup>, M. Emília Amaral<sup>2</sup>, Fernanda Domingues<sup>2</sup>,  
Ana Paula Duarte<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Paper Science and Technology, University of Beira Interior, 6201-001  
Covilhã, Portugal

<sup>2</sup>Research Unit of Textile & Paper Materials, University of Beira Interior, 62001-001  
Covilhã, Portugal

**Keywords:** Flavonoids, Solvent extraction, Forestry residues; Shrubs, Maritime pine

### Introduction

The Portugal forest area represents around 38% of the territory, which could represent a large quantity of forestry residues (pruning) and shrub species that can be used as raw material for biofuel production, like bioethanol. This subject is currently under investigation in our R&D Unit and attending to the biorefinery concept all the plants used in the project will be investigated for biologically active products. Among the bioactive compounds present in plants, polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant and anticarcinogenic activities (Ren et al., 2003). The present work is a preliminary study about the characterization of solvent extracts of some plant species studied in this project, namely *Pterospartum tridentatum* (known as *carqueja* in Portugal), *Cistus ladanifer* (rock-rose), *Arbutus unedo* (strawberry tree) and a wood species, *Pinus pinaster* (maritime pine). So, a study of the influence of some critical extraction variables (type of solvent, time of contact, solvent renovation and solid/liquid ratio) on the total and flavonoids yield of resultant extracts was carried out.

### Material and Methods

The arbustive species and pine residues were collected in May 2007 and stored at room temperature during six months. All plants consisted of wood/stalks, bark and leaves and were milled in a Retsch cutting mill to a particle size between 0,180 mm and 0,500 mm. The solvent extractions were carried out by maceration using methanol and ethanol 95% as solvents. Time contact and solid/liquid ratios were varied and the influence of solvent renovation was observed according to the following schema:

Ethanol maceration	{ <sup>1/10</sup>	{ <sup>1/10</sup>	{ <sup>1/10</sup>	Methanol maceration	{ <sup>1/10</sup>	{ <sup>1/10</sup>
	5 x 4h	2 x 10h	20h		2 x 24h	1 x 48h
	{ <sub>1/20</sub>	{ <sub>1/20</sub>	{ <sub>1/20</sub>		{ <sub>1/20</sub>	{ <sub>1/20</sub>
	{ <sub>1/50</sub>	{ <sub>1/50</sub>	{ <sub>1/50</sub>		{ <sub>1/50</sub>	{ <sub>1/50</sub>

Methanol was also used for an extraction with Soxhlet apparatus until the solvent became colourless. Flavonoids were determined by aluminium chloride colorimetric method using quercetin for the preparation of calibration curve (Pourmorad et al., 2006). All determinations were carried out in duplicate.

### Results and Discussion

All the studied lignocellulosic materials were found to be important sources of flavonoids, although the efficiency of the extraction varied with experimental conditions and plant species (Fig. 1 and 2). Among the two solvents used (ethanol and methanol), methanol was the most favourable for total extractables, but by using longer extraction times. For extracting flavonoids, the selectivity of both solvents was dependent on the plant species.

For some species, the flavonoids extraction was highly influenced by solvent renovation (e.g. *A. unedo*), while some others were negatively affected (*P. pinaster*).

\* Corresponding author. Tel + 351-275-319792. E-mail:apduarte@ubi.pt

The 1/10 ratio was found to give the best results for the flavonoids ethanol extraction from *A. unedo*, while from *P. pinaster* the ratio was 1/50. The extraction of flavonoids from *C. ladanifer* seemed to be the lesser influenced by the extraction conditions and solvent used.

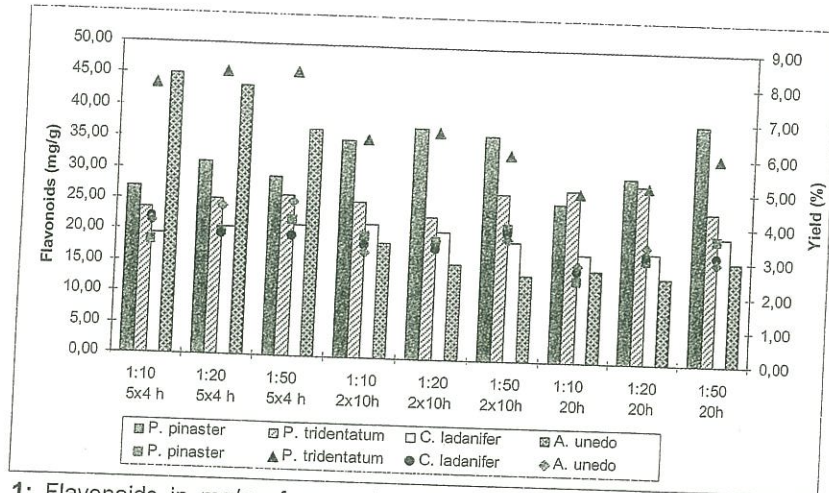


Fig. 1: Flavonoids in mg/g of oven dry material (columns) and total extract yields (markers) of plant extracts for different extraction conditions with ethanol 95%.

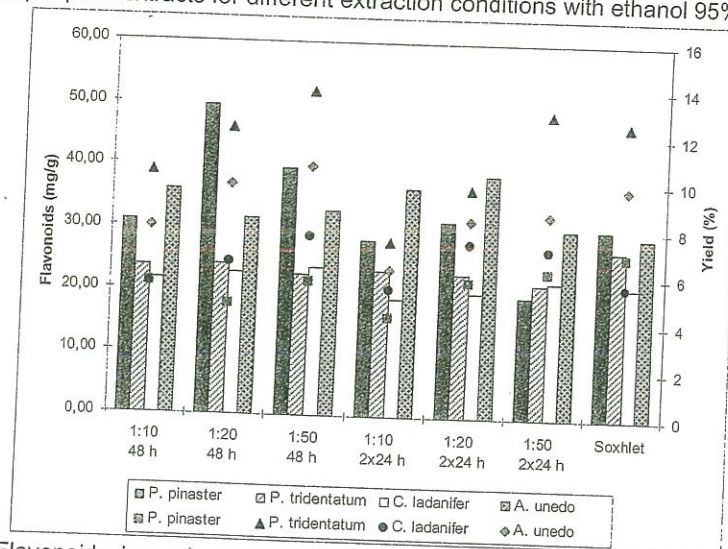


Fig. 2: Flavonoids in mg/g of oven dry material (columns) and total extract yields (markers) of plant extracts for different extraction conditions with methanol.

References

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J. Biotechnology*, 5, 1142-1145.

Ren, W., Zhenhua, Q., Hongwei, W., Zhu, L., Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23, 519-534.

## *Anexo XVII*

---

A. Luís, F. Domingues, C. Gil, A. P. Duarte (2009). Antioxidant activity of ethanolics and aqueous extracts of forest shrubs, Seminário Indústria Textil e Papeleira, Actas do Simpósio 2009 - Indústria Têxtil e Papeleira: Ensino e Investigação que Futuro?, ISBN:978-989-654-048-7, 3-4 dezembro 2009, Covilhã, Portugal



**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**  
Covilhã | Portugal

**UNIDADE DE MATERIAIS TÊXTEIS E PAPELEIROS**

**SIMPÓSIO 2009**  
**INDÚSTRIA TÊXTIL E PAPELEIRA:**  
**ENSINO E INVESTIGAÇÃO – QUE FUTURO?**

**LIVRO DE ACTAS**

**COVILHÃ, 3-4 DE DEZEMBRO DE 2009**

## Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of forest shrubs

Á. Luís<sup>1</sup>, F. Domingues<sup>2</sup>, C. Gil<sup>1</sup>, A. P. Duarte<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Unit of Textile & Paper Materials, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup>Health Sciences Research Center, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

### Abstract

Polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant and anticarcinogenic. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of extracts of some shrubs that grow spontaneously in Portugal (*Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica spp.*) and then to correlate it with total phenolic and flavonoids compounds. The Folin-Ciocalteu's method was used to determine total phenols while a colorimetric method with aluminum chloride was used for the determination of total flavonoids. Regarding the determination of antioxidant activity, DPPH assay was used. It was concluded that all the extracts presented relevant antioxidant activity and there was a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content.

### Introduction

The Portuguese forest area is around 3.3 million hectares which represents about 38 % of the territory (Moreira, 2008). This leads to the production of large quantities of forest residues composed by several different shrubs species and tree branches. Examples of shrubs that grow spontaneously in Portuguese forests are *Pterospartum tridentatum* (known as *carqueija* or *carqueja* in Portugal), *Cytisus scoparius* (broom), and *Erica spp.* (heather) (Moreira, 2008). Those plants can be used as raw material for achieving high value chemicals, like bioactive compounds. Among those bioactive compounds, polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant and anticarcinogenic activities (Cunha *et al.*, 2007; Alim *et al.*, 2009).

In recent years, the clinical importance of vegetal drugs has received considerable attention and recent investigations have shown that antioxidant properties of plants could be correlated with oxidative stress defense and different human conditions like the ageing process, the development of vascular complications associated with type 2 diabetes, cancer or atherosclerosis (Tawaha *et al.*, 2007; Pourmorad *et al.*, 2006; Márquez-García *et al.*, 2009; Aiyegoro *et al.*, 2009). For those aspects, flavonoids and other polyphenolic compounds have received the greatest attention (Pourmorad *et al.*, 2006; Márquez-García *et al.*, 2009). Scavenging of free radicals by antioxidants could reduce the oxidative process in the tissues (Pourmorad *et al.*, 2006). In this way, phenolics may act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers, thus preventing the evolution of antioxidant free radicals and reactive species derived from metal catalysis by Fenton-like reactions (Márquez-García *et al.*, 2009). Moreover, phenolics have a high tendency to chelate heavy metals, especially copper and iron, which

catalyze oxidation-reduction reactions (Márquez-García *et al.*, 2009).

The purpose of this work was to determine the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of some shrubs (*Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica spp.*) and then try to correlate it with total phenolic compounds and total flavonoids. The Folin-Ciocalteu's method was used for the determination of total phenols, a colorimetric method with aluminum chloride was used in the determination of total flavonoids and the method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil) was used to assess the antioxidant activity.

### Materials and Methods

#### Plant material

Plant materials were dried at room temperature during 3 months and reduced to coarse powder (< 2 mm) using a laboratory cutting mill.

#### Extraction process

Ethanolic extracts were carried out with Soxhlet apparatus, using 100 g of plant and 1000 mL of solvent. Aqueous extractions were performed by refluxing, using 100 g of plant samples during 30 minutes and with 1000 mL of water. The extract solutions were filtered and distilled under vacuum to a final volume of 150 mL. Then, 5 mL of each extract was diluted in 45 mL of methanol.

#### Total phenolic compounds and total flavonoids determination

The phenols were determined by Folin-Ciocalteu's colorimetric method. The standard curve was prepared using twelve solutions of gallic acid (500 - 50 mg/L) in methanol ( $y=0.0008x$ ;  $R^2=0.9769$ ) (Tawaha *et al.*, 2007; Pourmorad *et al.*, 2006). Aluminum chloride colorimetric method was used for flavonoids determination according to Pourmorad, F. *et al.* (2006). The calibration curve was constructed by preparing eight quercetin solutions at concentrations ranging from 12.5 to 200  $\mu\text{g/mL}$  in methanol ( $y=0.0068x$ ;  $R^2=0.9993$ ).

#### Evaluation of antioxidant activity - DPPH scavenging assay

The antioxidant activity of the extracts and standards (gallic acid and trolox) was determined by the radical scavenging activity method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) as it was described by Scherer, R. *et al.* The antioxidant activity was expressed as the antioxidant activity index (AAI), calculated as follows as (Scherer *et al.*, 2009):

$$AAI = \frac{\text{final concentration of DPPH } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})}$$

Thus, the AAI was calculated considering the mass of DPPH and the mass of the tested compound in the reaction, resulting in a constant for each compound,

independent of the concentration of DPPH and sample used. In this work it was considered that shrub extracts showed poor antioxidant activity when AAI < 0.5, moderate antioxidant activity when AAI between 0.5 and 1.0, strong antioxidant activity when AAI between 1.0 and 2.0, and very strong when AAI > 2.0 according to Scherer, R. *et al.*

## Results and Discussion

### Total phenolic compounds

The extract that displayed the highest concentration of total phenols (Table 1) is the ethanolic extract of *Cytisus scoparius* and the extract that showed the lowest concentration of total phenols (Table 1) is the aqueous extract of *Cytisus scoparius*. Among the ethanolic extracts, the extract which had the highest amount of phenols is the one from *Cytisus scoparius* while *Erica spp.* had the lowest amount of total phenols (Table 1). Regarding aqueous extracts, *Pterospartum tridentatum* presented the greatest amount of total phenols (Table 1). The total phenolic content is also very similar among the studied species. In this case, it seems that the type of solvent does not influence the quantity of phenolics extracted, as it only depends on the type of shrub.

### Total flavonoids

The extract that had the highest concentration in total flavonoids is the ethanolic extract of *Cytisus scoparius*, while the aqueous extract of *Erica spp.* showed the lowest concentration of total flavonoids (Table 1). Among the ethanolic extracts, the extract which had a higher amount of flavonoids (Table 1) was the extract of *Cytisus scoparius* and *Pterospartum tridentatum* presented the least amount in total flavonoids (Table 1). In other way, flavonoids composition of extracts showed that ethanol extracted more flavonoids than water.

### Antioxidant activity by DPPH method

The extract that required the lowest concentration to promote 50% of inhibition (Table 1), was the aqueous extract of *Erica spp.*. Thus, the antioxidant activity of this extract is greater than the others; and the value of the AAI is also the largest of all the extracts (Table 1), which classifies the activity of this extract as being a strong antioxidant.

Except for *Cytisus scoparius*, the aqueous extracts (Table 1) have a higher AAI than the ethanolic extracts of the same species.

Of all studied extracts, *Cytisus scoparius* (Table 1) had the lowest antioxidant properties.

The studied extracts presented lower antioxidant activity than the reference compounds, with the lowest antioxidant activity being attributed to *Cytisus scoparius* aqueous extract (Table 1).

All the studied extracts presented radical scavenging capacity, as it can be observed in Table 1.

### Relationship between phenolics, flavonoids and antioxidant activity

It can be observed that the content of phenolics in the extracts correlates with their antiradical activity (Ethanolic extracts  $R^2=0,9781$ ; Aqueous extracts

$R^2=0,8186$ ), this fact is more obvious for ethanolic extracts, which probably indicates that ethanol extracts phenolic compounds with more pronounced antioxidant properties. Those results suggest that the phenolic compounds contribute significantly to the antioxidant capacity of the investigated shrub species. Surprisingly, there is no correlation between the flavonoids and antioxidant activity of extracts analyzed ( $R^2=0,013$  for the ethanolic and  $R^2=0,0061$  for the aqueous extracts), as it was mentioned by other authors (Tawaha *et al.*, 2007; Miliuskas *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007).

## Conclusions

All the studied extracts presented antioxidant activity. There was a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content for aqueous and ethanolic extracts. It is noteworthy that there is no correlation between flavonoids and antioxidant activity of the extracts.

## References

- Aiyegoro, A., Afolayan, J., and Okoh, A. *In vitro* antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. *J. Med. Plants Res.* 3:462-467, 2009.
- Alim, A., Goze, I., Goze, H., and Tepe, B.. *In vitro* antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss. *J. Med. Plants Res.* 3:413-419, 2009.
- Cunha, A., Teixeira, F., Silva, A. and Roque, O, *Plantas na Terapêutica: Farmacologia e Ensaio Clínicos 2007*, First Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Márquez-García, B., Fernández, M., and Córdoba, F. *Bioresource Technology*, 100, 446–45, 2009.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., and van Beek, T. *Food Chemistry*, 85: 231–237, 2004.
- Moreira, J. *Árvores e Arbustos em Portugal 2008.*, First Ed., Argumentum, Lisboa.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., and Shahabimajid, N. *African Journal of Biotechnology*, 5:1142-1145, 2006.
- Scherer, R. and Godoy, H. *Food Chemistry*, 112: 654–658, 2009.
- Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J., and Larondelle, Y. *Food Chemistry*, 101:1012–1018, 2007.
- Tawaha, K., Alali, F., Gharaibeh, M., Mohammad, M., and El-Elimat, T. *Food Chemistry*, 104:1372–1378, 2007.

Table 1. Extraction yield, total phenolic content and antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of some Portuguese shrubs.

Extracts	Shrub	Extraction yield (%)	Total phenolic content (Gallic acid equivalents mg/g of dry mass)*	IC <sub>50</sub> (mg/L) *	AAI *	Antioxidant activity
Ethanolic	<i>Erica spp.</i>	11.64	141.49 ± 1.23	41.28 ± 1.90	1.40 ± 0.07	Strong
	<i>Pterospartum tridentatum</i>	28.61	196.61 ± 3.94	60.39 ± 1.78	0.97 ± 0.03	Moderate
	<i>Cytisus scoparius</i>	11.76	225.32 ± 4.08	65.43 ± 2.47	0.86 ± 0.03	Moderate
Aqueous	<i>Erica spp.</i>	4.64	212.73 ± 1.64	34.53 ± 1.45	1.72 ± 0.08	Strong
	<i>Pterospartum tridentatum</i>	12.01	222.69 ± 5.12	42.97 ± 1.69	1.30 ± 0.05	Strong
	<i>Cytisus scoparius</i>	4.98	134.67 ± 0.14	120.42 ± 5.33	0.45 ± 0.02	Poor
Trolox	---	---	---	7.10 ± 0.08	7.18 ± 0.08	Very Strong
Gallic Acid	---	---	---	1.81 ± 0.02	30.72 ± 0.27	Very Strong

\* Results in terms of mean ± standard deviation.

## ***Anexo XVIII***

---

Prémio Tecnicelpa 2007 com a comunicação:

- N. Gil, C. Gil, M. E. Amaral, A. P. Costa, A. P. Duarte (2007). “Biorefinação- Uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*”, XX Encontro Nacional da Tecnicelpa, 135-141, 10-12 outubro 2007, Tomar, Portugal.



# Diploma

A Tecnicelpa - Associação Portuguesa dos Técnicos das  
Indústrias de Celulose e Papel atribui o

**Prémio Tecnicelpa 2007**

ao Trabalho *“Biorefinação - Uso de Enzimas no  
Melhoramento da Refinação de uma Pasta Kraft  
Branqueada de Eucalyptus Globulus”*

apresentado no XX Encontro Nacional da Tecnicelpa,  
realizado em Tomar, de 10 a 12 de Outubro de 2007.

Tomar, 12 de Outubro 2007

O Presidente do Conselho  
Directivo da Tecnicelpa

*Paulo Alexandre Barata*

O Presidente  
do Júri

*[Handwritten Signature]*