UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Claudia Conti Medugno

Mecanoquímica da celulose: efeito de aditivos na moagem sobre
a extensão e a velocidade da hidrólise enzimática

Departamento de Bioquímica

Dissertação de Mestrado
orientada por
Prof. Dr. Fernando Galembeck

São Paulo
1982

agradeço à Escola de Engenharia Mauã

agradeço, por razões profissionais e particulares, às seguintes pessoas: Fernando Galembeck, Bruno Roberto Victor Concone, Marina Lessa de Castro, Iracema Fagã, Shirley Schreier, Ulpiano Toledo Bezerra de Menezes, Ana Maria Barini Paulo, Jacyr Ubirajara Costa, Sérgio, André, Fábio e Martha Isabel

RESUMO

O processamento de celulose em moinho de bolas de porcelana produz um pó no qual se detecta a presença de radicais livres, por Ressonância Paramagnética Eletrônica. O espectro obtido é complexo e pode ser decomposto em pelo menos dois sinais: uma linha instável, eliminada após alguns dias de exposição ao ar, e outra estável, que decai lentamente por aquecimento a 400-500°C, e desaparece a 900°C. A moagem simultânea de celulose com amido, acrilamida, azul de dextrana e sacarose produz celulose quimicamente modificada. Por exemplo, no caso da acrilamida, dosagem pelo método Kjeldahl revela a presença de até 0,65% de nitrogênio no material obtido após lavagens exaustivas. A celulose moída na presença de vários reagentes foi submetida a ensaios de hidrólise e em alguns casos, mostrou-se significativamente mais suscetível ao ataque enzimático do que a celulose simplesmente moída. Os resultados deste trabalho mostram que a conversão enzimática de celulose em açúcares redutores é sensível a uma pequena modificação no pré-tratamento mecânico-químico.

ABSTRACT

Cellulose processing on porcelain ball mill produce a powder in which one can detect free radicals by means of Electronic Paramagnetic Ressonance. The spectrum attained is complex and it may be decomposed in at least two signals: an unstable line that is eliminated after some days of exposition to air and another stable line, which slowly decays due to heating at 400-500⁰C and disappears at 900⁰C. Cellulose simultaneously milled with starch, acrylamide, dextran blue and saccharose produce chemically modified cellulose. For instance, when using acrylamide one can detect, by means of the Kjeldhal method, the existence of nitrogen up to 0.65% in the material obtained after exhaustive washings. In some cases cellulose milled with several reactants seemed to be significantly more susceptible to the enzymatic attack during hydrolysis than cellulose milled without any reactant. The results of this work show that the enzymatic conversion of cellulose into reducible sugars is sensible to a little change in the mechano-chemical pre-treatment.

INDICE

pág.

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais	1
1.1.1 - O sistema celulase	3
1.2 Aspectos Relevantes de Estrutura Fina	5
1.2.1 - Celulose	5
1.2.1.1 - Estrutura de Fibra	6
1.2.1.2 - Polimorfismo	10
1.2.2 - Inchamento em Água, Corneificação e Compostos de Inclusão	10
1.2.3 - Celulose Amorfa	12
1.2.4 - Recristalização	14
1.2.4.1 - Recristalização e Hidrólise	16
1.2.5 - Aspectos Estruturais e Hidrólise Enzimática	18
1.3 Mecanoquímica	22
1.3.1 - Mecanoquímica da Celulose	22
1.3.1.1 - Mecanismo	22
1.3.1.2 - Extensão e Velocidade da Ação Mecânica	24
1.3.1.3 - Efeito da Água	27
1.3.1.4 - Efeito da Porcelana	30
1.3.2 - Mecanoquímica de sólidos inorgânicos	31

1.4 Radicais Livres	33
1.4.1 - Radicais livres iniciados por aquecimento	33
1.4.2 - Radicais livres iniciados por ação mecânica	35
1.5 Objetivos	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 Mecanoquímica	38
2.1.1 - Preparação do moinho	38
2.1.2 - Condições de umidade no interior do moinho	39
2.2 Evidência da Formação de Radicais Livres - Ressonância Paramagnética do Elêtron	40
2.3 Ensaio de Enxertia	41
2.4 Hidrólise Enzimática	42
3. RESULTADOS	43
3.1 Evidências da Formação de Radicais Livres - Ressonância Paramagnética do Elêtron (RPE)	43
3.1.1 - Comportamento da Porcelana	43
3.1.1.1 - Aparecimento de sinal RPE intenso	43
3.1.1.2 - Condições para o aparecimento de um sinal de fraca intensidade	44
3.1.1.2 - Influência da umidade no comportamento da porcelana	46
3.1.2 - Comportamento da celulose	46

3.1.2.1 - Condições para o aparecimen <u>to</u> apenas da linha de celu- lose	46
3.1.2.2 - Condições para obtenção de espectros mostrando sinais de celulose e porcelana su- perpostos	47
3.1.2 - Conclusões	50
3.2 Enxertia	51
3.2.1 - Evidências quantitativas de enxertia	51
3.2.2 - Avaliação quantitativa de enxertia	52
3.2.2.1 - Acrilamida	52
3.2.2.2 - ^{14}C Sacarose	53
3.3 Hidrólise Enzimática	55
3.3.1 - Moagem de celulose em presença de di- versos materiais: efeito sobre a ex- tensão e a velocidade da hidrólise en- zimática	55
3.3.2 - Conclusões	60
4. DISCUSSÃO	61
4.1 Aspectos Estruturais	61
4.1.1 - Mecanoradicais	61
4.1.2 - Enxertia e Hidrólise Enzimática	
4.1.3 - Sobre a Estrutura de Poros e Capila- res	68
4.2 Aspectos Tecnológicos	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela nº	Título	pág.
1.1	Índice de cristalinidade e extensão da digestão	19
1.2	Solubilidade de oligossacarídeos	26
1.3	Efeito da umidade residual sobre a ação mecânica	28
1.4	Efeito da água sobre a ação mecânica	28
1.5	Variação da viscosidade com a temperatura	31
3.1	Extrato aquoso de celulose moída com azul de dextrana. Variação da % de Transmissão com o tempo de extração	52
3.2a	Variação do teor de nitrogênio nas amostras moídas com acrilamida	53
3.2b	Variação do teor de nitrogênio nos controles encharcados com acrilamida	53
3.3	cps/g antes e após a extração	55
3.4	Variação da porcentagem de sacarificação com o tempo	55
3.5	% de sacarificação de celulose incubada a 50°C, pH = 4,8 em solução 0,6% de MAXAZYME CL; efeito de aditivos e/ou aquecimento	57
Quadro I	Recristalização de celulose natural	17

LISTA DE FIGURAS

Figura nº	Título	pág.
1.1	Diagrama da molécula de celulose, mostrando a conformação cadeira das unidades de glicose e a posição equatorial dos grupos hidroxila	7
1.2	Unidade da cela de celulose I	8
1.3	Pontes de hidrogênio e arranjo das moléculas de celulose na celulose natural	9
1.4	Desenho feito a partir de uma fotomontagem de TØNNESEN & ELLEFSEN (1971); o modelo mostra a rotação máxima de 90 ⁰ , entre os sucessivos planos dos anéis de anidroglicose	13
1.5	Variação da viscosidade com a porcentagem de porcelana (8 horas de moagem vibratória a 20 ⁰ C)	30
1.6	Formação de levoglucosan	33
1.7	Efeito da temperatura e tempo de aquecimento na iniciação de radicais livres no algodão	34
3.1	Sinal de porcelana; ganho = 8×10^2	44
3.2	Sinal fraco de porcelana; ganho = 8×10^3	45
3.3	Decaimento da linha fraca de porcelana; ganho = 8×10^3	45

3.4	Sinal atribuído à celulose; ganho = 8×10^3	47
3.5	Superposição das linhas de celulose e porcelana; ganho = 8×10^3 . Moagem efetuada após aquecimento a 105°C por 24 horas	48
3.6	Superposição espectral de celulose e porcelana; ganho = 8×10^3 . Moagem efetuada em atmosfera de nitrogênio	48
3.7	Superposição espectral de celulose e porcelana. Pó obtido após 9 dias de moagem	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais*

A transformação da celulose em álcool é problema que, a partir do agravamento da crise energética mundial, passou a assumir importância crescente. Daí o grande volume de trabalhos dedicados à matéria na última década.

Calcula-se que anualmente as plantas produzam 100 bilhões de toneladas de celulose, principal componente de suas paredes celulares. A reciclagem de uma soma tão impressionante de material é facilitada por alguns microorganismos, dotados de enzimas capazes de hidrolisar o polissacarídeo. É este processo hidrolítico enzimático que poderá dar à celulose um caráter estratégico como fonte de energia.

A conversão enzimática oferece vantagens sobre os outros processos alternativos. Assim, a queima de resíduos celulósicos pode prover energia térmica, mas essa energia deve ser usada no local de produção. As enzimas permitem a transformação de celulose em combustíveis líquidos, mais fáceis de estocar e transportar.

A celulose pode ser hidrolisada por ácidos, mas são necessários equipamentos caros, à prova de corrosão; além disso, os ácidos são capazes de reagir com impurezas do meio, dando origem a produtos secundários não dese-

*a partir de JURASEK & BROWN (1979); GHOSE & GHOSH (1978); SKINNER (1975) e LIPINSKY (1979).

jáveis. Aproximadamente 30% dos açúcares produzidos são decompostos. As enzimas são altamente específicas e agem sob condições moderadas.

O interesse comercial na hidrólise da celulose incentivou a procura de métodos mais eficazes de conversão. O que existe disponível no mercado como matéria prima de interesse para o processo não é, obviamente, celulose pura. Resíduos agrícolas e industriais incluem vários tipos de contaminantes, entre os quais substâncias que podem inibir as enzimas. A matéria prima típica para o processamento da celulose é o complexo lignina-hemicelulose-celulose. A hidrólise enzimática desse complexo se processa lentamente devido a fatores estéricos. Vários pré-tratamentos podem ser requeridos para reduzir tamanho de partícula e separar os constituintes do complexo. Todas essas operações têm por objetivo transformar a matéria prima relativamente inerte em um substrato celulolítico ou, em outras palavras, *aumentar a velocidade e a extensão da hidrólise enzimática.*

Dois pré-tratamentos, o processo Purdue (LADISCH, LADISCH & TSAO, 1978) e o processo Iotech (MARCHES SAULT & St-PIERRE, 1978), têm sido considerados os melhores na preparação do material lignocelulósico para a hidrólise.

Os métodos utilizados pelo grupo de Purdue exploram a dissolução da celulose (cadoxen, tartarato fêrrico e ácido sulfúrico/metanol). O custo da recuperação do solvente é um fator crucial para que o processo seja viável do ponto de vista econômico.

O processo Iotech emprega despressurização explosiva: antes da explosão, a biomassa é submetida a um pré-tratamento específico com vapor, que encharca as regiões intercristalinas da celulose. Quando a pressão é diminuída de forma brusca, o complexo lignina-hemicelulose-celulose literalmente explode. A celulose obtida não perdeu a cristalinidade, mas tem uma enorme área superficial quando comparada com o material de partida. O processo é promissor porque é efetivo e de baixo consumo energético.

A cominuição convencional (especialmente em moinho vibratório e de dois rolos) aumenta a suscetibilidade da celulose a reagentes hidrolíticos. Existe concordância que é um pré-tratamento excelente, porém de custo proibitivo (LIPINSKY, 1979). A eficácia é costumeiramente associada à quebra de cristalinidade, separação de lignina e aumento da área superficial.

A moagem de celulose é vista pela maioria dos trabalhos tecnológicos como uma operação unitária, e o mecanismo da ação mecânica tem sido tratado de maneira superficial. Em laboratório, a moagem é usada na preparação de celulose amorfa para estudos de estrutura fina (raio-X e espectroscopia de infravermelho).

1.1.1 O sistema celulase (a partir de KULP, 1975; MANDELS & REESE, 1964 e WOOD & Mc CRAE, 1979)

Preparações enzimáticas, livres de células e capazes de solubilizar celulose natural contêm três

tipos de enzimas:

- (a) C_1 , um fator necessário para a quebra de celulose altamente cristalina: embora haja concordância em que C_1 é essencial, há sérias controvérsias sobre seu modo de ação;
- (b) β -glucanases, que são de dois tipos, a exo- β -1,4 e a en-do- β -1,4-glucanases. A exoenzima remove sucessivas unidades de glicose, efetuando inversão de configuração no carbono anomérico. A endoenzima quebra as cadeias de celulose aleatoriamente. A atividade das β -glucanases é também referida como atividade C_x . C_x pode agir isoladamente, solubilizando derivados da celulose (carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose), e celulose que tenha sido modificada por moagem ou inchamento em álcali ou ácido concentrado, mas é incapaz de atacar a região cristalina;
- (c) β -glucosidases, que mostram maior afinidade com os substratos de baixo peso molecular.

A quebra enzimática da celulose natural pode ser assim representada (MANDELS & REESE (1964)):

1.2 Aspectos Relevantes de Estrutura Fina

1.2.1 Celulose (a partir de ELLEFSEN & TØNNESEN (1971) e HOWSMON & SISSON (1954))

Celulose seca tem uma composição química que corresponde à fórmula empírica $[C_6H_{10}O_5]_n$, onde n é o grau de polimerização (GP).

A expressão $[C_{12}H_{20}O_{10}]_n$, onde $n \approx \frac{GP}{2}$, introduz a endocadeia de anidrocetobiose como sendo a *unidade estrutural* das moléculas de celulose. A maior parte da celulose natural das paredes secundárias das plantas possui um grau de polimerização alto e uniforme, calculado em torno de 14000. O maior comprimento da molécula do monômero (anidroglicose) é 5-Å. Então, o valor do comprimento de uma cadeia estendida é 70000 Å, ou quase 0,01 mm.

A micrografia eletrônica de celulose natural de diversas fontes indica a presença de fibrilas elementares de 3nm de diâmetro, como unidade estrutural básica. Essas se agrupam em fibrilas maiores, de secção transversal variando de 100 a 200 nm, que por sua vez se reúnem para formar a unidade morfológica maior, a fibra.

A celulose ocorre na natureza quase sempre em forma de fibras, embora sua natureza fibrosa nem sempre seja óbvia. Uma vez que as fibras não são solúveis nos solventes comuns e se decompõem ao invés de fundir com o aquecimento, elas não são prontamente convertidas em outras formas nas quais a resistência à tração inerente da celulose possa ser mantida. No entanto, foram desenvolvidos processos

industriais baseados na conversão química da celulose a produtos solúveis, a partir dos quais ela é regenerada em novas formas.

Quando a celulose é tratada com hidróxido de sódio e dissulfeto de carbono, há formação de xantato de celulose, uma dispersão coloidal amarela que recebe o nome de *viscose*. Se a viscose é forçada através de pequenos orifícios (fiação têxtil) para um banho ácido, a celulose é regenerada como filamentos de *rayon viscose*; se houver extrusão através de uma fenda, a folha de celulose recebe o nome de celofane.

Em 1851, John Mercer patenteou o processo de transformar celulose natural em hidrato de celulose através de inchamento intracristalino das fibras e remoção do agente intumescedor à temperatura ambiente (mercerização). A importância industrial do processo foi aumentada pela aplicação de força tensora (puxamento) às fibras; isto evita o encolhimento e aumenta o brilho e a resistência das mesmas.

1.2.1.1 Estrutura de fibra

A condição de fibras, segundo MARK (1954) é dada pela facilidade com que uma cadeia polimérica se ajusta lateralmente a um arranjo cristalino.

Grupos fortemente polares ou com capacidade para formar pontes de hidrogênio, se regularmente distribuídos ao longo das macromoléculas, possibilitam a formação de domínios com ordenação lateral. Esse efeito será tanto mais pronunciado quanto mais próximos estiverem os grupos e

quanto maior a perfeição do encaixe entre eles. Substituintes volumosos não polares, distribuídos assimetricamente, dificultam o estabelecimento de pontes de hidrogênio e promovem assimetria.

Macromoléculas de cadeias rígidas e inflexíveis cristalizam com mais facilidade que as com elevado grau de flexibilidade interna. A celulose mostra uma particular tendência para a cristalização devido à relativa rigidez das cadeias glicosídicas e à capacidade de formar pontes de hidrogênio de seus grupos hidroxila (três por unidades de anidroglicose) Figura 1.1.

Figura 1.1 - Diagrama da molécula de celulose, mostrando a conformação cadeira das unidades de glicose e a posição equatorial dos grupos hidroxila.(SEGAL (1971)).

As cadeias estão unidas em vários graus de ordenação lateral, variando de um perfeito empacotamento geométrico a uma distribuição aleatória. Uma determinada molécula pode passar por regiões de diversos graus de ordens ao longo de seu comprimento.

"Considerando a posição dominante que a celulose possui como alto polímero de plantas marinhas e terrestres, parece lógico atribuir esse fato à propriedade ine-

rente das cadeias de serem capazes de se organizar em uma variedade de sistemas estruturais. A capacidade de formar uma estrutura variada que não é absolutamente perfeita do ponto de vista de um cristal é provavelmente a principal razão pela qual a cadeia de celulose satisfaz tão bem a condição de unidade estrutural das plantas. Se a celulose fosse um alto polímero com preferência para a perfeita cristalização, não teria a flexibilidade necessária para se arranjar em estruturas úteis (fibrilas e fibras)".(ELLEFSEN & TØNNESEN (1971)).

A cela unitária geralmente adotada para a celulose natural é postulada por MEYER & MISCH (1939)(Figura 1.2).

Figura 1.2 - Unidade da cela de celulose I.(MEYER & MISCH (1939))

A forma chata dos anéis de anidroglicose e a distribuição espacial dos grupos de hidroxila favorecem a formação de fitas triplamente anisotrópicas no que diz respeito às forças de ligação envolvidas.

O espectro de infravermelho obtido por ra diações plano-polarizadas dão informações valiosas no que diz respeito às ligações hidrogênio. A partir da polarização das bandas na região de estiramento OH, LIANG E MARCHESSAULT (1959) propuseram um sistema de ligações hidrogênio para a estrutura cristalina da celulose I (Figura 1.3).

Figura 1.3 - Pontes de hidrogênio e arranjo das moléculas de celulose na celulose natural.(LIANG E MARCHESSAULT (1959))

A região cristalina pode ser descrita como aquela onde prevalece a ordem, e as distâncias entre moléculas vizinhas são governadas por leis estritas. Por outro lado, a região amorfa não pode ser definida pela total ausência de geometria; não há conexão entre celulose amorfa obtida por exemplo, por moagem e as regiões amorfas das fibras não tratadas. Tais regiões não existem como uma fase distinta em um determinado volume, mas podem ser consideradas como contendo todos os graus de empacotamento intermediário entre o estado líquido e o cristalino.

1.2.1.2 Polimorfismo (SEGAL, 1971; HOWSMON & SISSON, 1954)

Hã quatro modificações cristalinas I, II, III e IV, nas quais os planos dos anéis de anidroglicose ocupam diferentes posições. Apenas duas ocorrem na natureza: celulose I (celulose natural), na maioria das fibras, e celulose II (hidrato de celulose), na alga marinha *Halicystis*. As outras formas são obtidas a partir de intermediários químicos.

A transformação de um retículo em outro é um fenômeno interessante, embora nenhuma propriedade tecnológica importante possa ser atribuída a diferenças nas formas cristalinas. Foram feitas diversas constatações experimentais para mostrar que existe correlação entre propriedades físicas e grau de cristalinidade, sem levar em conta se se trata da forma I ou II.

A dissolução e reprecipitação de celulose é acompanhada de grandes variações nos parâmetros estruturais, como absorção de umidade, inchamento, densidade e difração de raios-X. Qualquer aumento na reatividade ou acessibilidade pode ser relacionada com redução no tamanho dos cristaltitos e aumento das áreas amorfas que acompanham essas transformações.

1.2.2 Inchamento em Água, Corneificação* e compostos de Inclusão (WARWICKER, 1971; HOWSMON & SISSON, 1954; SEGAL, 1971)

Sólidos poliméricos incham ao ser embebi-

*do inglês "hornification".

dos em um líquido, sem perder sua aparente homogeneidade; a coesão diminui e os sólidos se tornam mais flexíveis. Líquidos e vapores causam inchamento quando são miscíveis com o sólido; esta miscibilidade é aumentada pela capacidade de formar pontes de hidrogênio com o polímero. A extensão do fenômeno é ditada pelas forças de ligação entre as cadeias.

A água incha a celulose, e há poucas dúvidas de que o inchamento seja totalmente intercrystalino; é muito difícil quebrar a densa rede de ligações hidrogênio das regiões cristalinas. A influência da ordenação lateral das fibras se faz sentir na magnitude do inchamento; assim, a área da seção transversal de fibras regeneradas aumenta de 55 a 70% por adição de água, enquanto que o aumento da área de fibras naturais é de 20 a 30%.

A água afeta a morfologia da celulose em nível de estrutura fina, tornando os grupos hidroxila mais acessíveis a reagentes.

Na prática industrial é bem conhecido que, para preservar a reatividade, celulose deve ser mantida úmida.

Condições drásticas de secagem acarretam um colapso da estrutura, forçando a saída de toda a água do interior das fibrilas. Há formação de ligações cruzadas na região amorfa, entre as cadeias de celulose. Essas ligações são mais difíceis de quebrar por um reagente do que as ligações celulose-H₂O-celulose.

Celulose excessivamente seca tem um aspec

to semelhante ao de queratina de unha ou chifre, daí chamar-se o processo de corneificação. (A secagem a ar não é condição para que o fenômeno ocorra).

Quando é necessário se obter celulose reativa, livre de água, esta é removida por outros solventes. Se a partir daí a fibra for seca, é formada celulose inclusa, que contém uma certa quantidade do solvente preso dentro da estrutura. Mesmo secando a celulose acima do ponto de ebulição do líquido aprisionado, não ocorre a liberação do mesmo. *No entanto, ele pode ser extraído por reumedecimento com água.*

Os compostos de inclusão são semelhantes a clatratos, mas não há qualquer estequiometria (ou ligação química) com a estrutura da celulose na qual eles estão embebidos.

A inclusão causa ativação da celulose, porque as moléculas presas separam as cadeias, impedindo a formação de novas pontes e mantêm as moléculas de celulose em uma condição mais acessível a reagentes.

1.2.3 Celulose Amorfa (TØNNESSEN & ELLEFSEN, 1971)

Celulose amorfa pode ser preparada a partir do estado sólido através de moagem vibratória, ação de $ZnCl_2$ e éter, evaporação de amônia de amônia-celulose, e a partir de soluções, por precipitação. Em todos os casos a desordenação reticular é conseguida pela quebra de pontes de hidrogênio.

Na celulose amorfa obtida mecanicamente e

por evaporação de amônia de amônia-celulose, a estrutura microfibrilar não é perdida. A nível molecular, o retículo sofre danos mais por deslocamento de grupos de átomos, não havendo a ocorrência de grandes movimentos de translação (HESS KIESSIG & GUNDERMANN, 1941). Uma desordem rotacional é conseguida por deslocamento dos anéis de anidroglicose, sem que o comprimento global dos segmentos de cadeia mais extensos seja alterado (Figura 1.4). Então, um padrão de raio-X difuso, semelhante ao de estado líquido pode ser obtido com pouca perda de paralelismo entre as cadeias.

Figura 1.4 - Desenho feito a partir de uma fotomontagem de TØNNESEN & ELLEFSEN (1971); o modelo mostra a rotação máxima de 90° , entre os sucessivos planos dos anéis de anidroglicose.

A celulose amorfa obtida por precipitação de soluções foi chamada, por TØNNESEN & ELLEFSEN (1971), de amorfa "idealizada". A estrutura que existe em solução não deve ser drasticamente alterada pela transição ao estado amorfo. Se o solvente for eliminado em passos sucessivos, sem a aplicação de forças externas, presume-se que ocorra uma ordenação mínima intercadeias durante a precipitação. No entanto, já em solução existe um limite quanto à existência de uma estrutura completamente desordenada. Os segmentos de ca-

deia devem ser estabilizados por algum tipo de formação irregular de pontes de hidrogênio intramoleculares.

Então, mesmo a celulose amorfa "idealizada" possui um estado de ordem parcial ditado por certo endireitamento das cadeias. A contração de volume que ocorre quando a celulose é precipitada permite supor o aparecimento de cadeias com dobras agudas, ao lado de cadeias alinhadas; mas a existência dessas dobras, que pode ocorrer no estado amorfo, ainda não foi experimentalmente verificada.

É possível que exista uma diferença quantitativa, difícil de estabelecer, entre a estrutura amorfa obtida por moagem ou amônia-celulose e a amorfa "idealizada" (precipitação de soluções). A diferença seria relativa ao número de dobras e à extensão do alinhamento das cadeias.

Foi visto que o estado amorfo pode ser introduzido por tratamentos que permitam um desordenamento rotacional, sem muita alteração no paralelismo das cadeias. Uma forte evidência experimental que confirma essa hipótese é a facilidade com que ocorre recristalização por simples adição de água.

1.2.4 Recristalização

É bem conhecido que a água (líquida ou vapor) provoca recristalização de celulose amorfa (HESS, KIESSIG & GUNDERMANN, 1941).

Os detalhes da recristalização são ainda pouco conhecidos. Admite-se que a água oferece mobilidade às cadeias (plastificação), de modo a haver uma "escolha" da con

formação termodinamicamente mais favorável. A extensão da re cristalização depende de quanto o tratamento permite que for ças intermoleculares sejam acionadas.

A capacidade da água para formar pontes de hidrogênio parece exercer um papel fundamental. O fato de uma série de alcoois alifáticos (C_1 a C_5) não promover a re cristalização de celulose amorfa é uma evidência experimen tal que confirma essa hipótese (WADEHRA & MANLEY, 1965).

O tipo de retículo reconstituído (I, II ou IV), depende das condições de moagem e recristalização.

Se a celulose é moída por pouco tempo, o padrão difratométrico obtido é o da celulose I. A formação de hidrato de celulose exige uma completa quebra da rede, por que os resíduos de cristais de celulose I agem como uma for ma de memória, governando a recristalização; são núcleos efe tivos, embora existam em quantidade tão pequena que não po dem ser detectados por raio-X. Há mais do que uma ordenação lateral, um processo sequencial e cooperativo de alinhamento de segmentos a partir dos núcleos (zippering up) (HOWSMON & MARCHESSAULT, 1959).

Cadeias livres podem ser obtidas através de intermediários químicos ou por moagem intensa; a cristali zação dessas cadeias na presença de água "in vitro" conduz rápida e invariavelmente à celulose II.

A partir desse fato, a re cristalização das cadeias livres nas células de organismos vivos, ricas em ã gua, passou a ser vista como improvável. A formação do retí-

culo de celulose natural foi atribuído a um sistema enzimático específico ou à síntese direta nas células (RANBY, 1952).

Celulose II é a organização reticular de menor entalpia. HOWSMON & MARCHESSAULT (1959), descobriram que celulose amorfa se recristaliza lentamente em 95% de umidade relativa com a reconstituição do padrão de celulose natural, e consideram o fato como sendo muito significativo (é até o presente, a única condição possível para se obter celulose I a partir de cadeias livres).

CAULFIELD & STEFFES (1969), mostraram que a recristalização está associada à absorção de umidade, e não à subsequente remoção de água por secagem.

O quadro I resume os dados existentes na literatura sobre o tipo de retículo reconstituído, a extensão e a velocidade de recristalização de celulose natural.

1.2.4.1 Recristalização e hidrólise (ácida e enzimática)

Quando a celulose é submetida à hidrólise ácida há, logo de início, um acentuado aumento na nitidez das linhas de interferência de raio-X. Esse efeito pode ser explicado como sendo decorrente de um ataque preferencial à região amorfa, mais suscetível. Porém, a melhor definição de raio-X é conseguida com muito pouca perda de peso da celulose, o que favorece a idéia de que a ruptura de ligação na região amorfa aumenta a mobilidade da cadeia, permitindo que ela se organize de forma regular (McBURNEY, 1954). No caso da hidrólise esse efeito recebe o nome de cristalização, mas

Quadro I - Recristalização de Celulose Natural

	Unidade Relativa					adição em água
	65%	75%	90%	95%	100%	
Celulose natural completamente amorfa obtida por:						
- 6 h de moagem vibratória (1)		Após 30 dias muito pouca recristalização; acessibilidade medida por troca isotópica H/T (2)	Após 4 dias nenhum início de recristalização por medida de raio-X (1)	uma semana de exposição - celulose I (3)	Após 48 h, cel. II (1) Aces. medida por troca isotópica H/T variou de 89 para 79%. A recristalização terminou em 4 h. Cel. II (2)	cristaliza com cel. II (1) (2) (3) (4) cristaliza com cel. II em 5 min (1) a 40°C, passa de 0 a 42,3% de cristalinidade (1)
- saponificação de triacetato de celulose em meio aquoso (2)						
- moinho rotatório, 400 horas (3)						
Celulose natural parcialmente decristalizada	Celulose I varia de 22 para 30% (1)	Celulose I varia de 22 para 37% (1)	Celulose I* varia de 22 para 44% (1)		Celulose I varia de 22 para 45% (1)	a 25°C, celulose I (3) a 40°C, a cristalinidade variava de 23 para 55% (1) celulose I (4)
- 15 min de moagem vibratória (1)						
- moinho rotatório 192 horas (3)						
* O Índice aumenta rapidamente no início da recristalização, e continua a aumentar até 200 horas. Os autores criticam o resultado como medida cinética, devido à lenta difusão de umidade na pastilha que permaneceu no interior do goniômetro.						
(1) CAULFIELD & STEFFES (1969); (2) WADEHRA & MANLEY (1965); (3) HOWSMON & MARCHESSAULT (1959); (4) HESS, KIESSING & GUNDERMANN (1941).						

como foi visto, o mesmo conceito tem sido usado para explicar o que ocorre quando celulose amorfa é exposta à umidade. HOWSMON & MARCHESSAULT (1959) verificaram que ácido clorídrico 5N é um pouco mais eficiente do que água para recristalizar polpa moída.

É possível que a celulose recristalize também durante a hidrólise enzimática, mas é difícil avaliar em que extensão (CAULFIELD & MOORE, 1974).

1.2.5 Aspectos Estruturais e Hidrólise Enzimática

A estrutura fina da celulose influi drasticamente na velocidade e extensão da hidrólise enzimática. É possível listar uma série de aspectos morfológicos relevantes como porosidade, capilaridade, área superficial específica, cristalinidade, grau de polimerização e capacidade de inchamento.

A preocupação em relacionar causas estruturais a efeitos cinéticos é muito recente (RYU, LEE, TASSINARI & MACY, 1982). A dificuldade de se conhecer a importância relativa de cada fator reside em parte no fato de que é praticamente impossível modificar cada um isoladamente. O efeito da morfologia a nível molecular pode ser comparado ao impedimento estérico nas moléculas mais simples da química orgânica (SEGAL, 1971).

CAULFIELD & MOORE (1974) estudaram a influência da cristalinidade da celulose moída (moinho vibratório) na velocidade e extensão da hidrólise enzimática. Uma vez que a hidrólise é feita em meio líquido, não foi usado o

Índice de cristalinidade do material seco e sim o de um controle após contato com a umidade pelo mesmo período de tempo e sob as mesmas condições das espécies digeridas (48 horas de incubação a 40°C; celulase comercial não fracionada).

Eles concluem que a relação entre o caráter amorfo e a digestibilidade parece não ser causal. Com o aumento do tempo de moagem, a acessibilidade enzimática da fração cristalina é aumentada em maior extensão do que a da fração amorfa, até quase alcançarem o mesmo valor. Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Índice de cristalinidade e extensão da digestão, (CAULFIELD & MOORE (1974)).

moagem vibratória	IC da ce- lulose seca (%)	IC no con- trole sem digestão (%)	IC no re- síduo após digestão (%)	Perda de peso na digestão (%)	Digestão relati- va do componen- te cristalino em relação ao amorfo (%)
0	75	75,8	79,7	24,5	0,54
5 min	39	68,4	75,7	35,3	0,57
10 min	33	66,0	72,6	40,5	0,67
15 min	23	55,0	63,0	46,7	0,69
30 min	27	36,0	46,3	55,7	0,69
6 horas	0	42,3*	43,0*	61,4	0,98
* Celulose II					

FAN, LEE & BEARDMORE (1980) preocuparam-se com pelo menos dois aspectos estruturais da celulose moída (moinho de bolas): área superficial específica e cristalinidade. No que diz respeito à cristalinidade, houve concordância com o trabalho de CAULFIELD & MOORE (1974). O índice

de cristalinidade varia muito pouco durante a hidrólise e as frações cristalina e amorfa são hidrolisadas em todos os estágios da reação.

A área superficial específica foi medida pela técnica de adsorção de nitrogênio em amostras secas, a partir de água e de solventes apolares. O histórico da fibra tem uma influência notável na área superficial: fibras das quais foi retirada toda a água perdem quase por completo a estrutura capilar (corneificação) e a área total varia de 0,5 a 1,0 m²/g. Se a mesma fibra é reidratada, a área pode chegar a 200 m²/g (STAMM, 1952).

A técnica de secagem com solventes apolares foi desenvolvida por ASSAF, HAAS & PURVES (1944), para a obtenção de dados que refletissem melhor a estrutura original da fibra encharcada em água.

Com as medidas da área superficial específica de celulose moída, FAN, LEE & BEARDMORE (1980) estariam preenchendo uma lacuna no conhecimento de fatores estruturais que afetam a hidrólise enzimática. No entanto, eles fizeram uma adaptação insatisfatória da complexa técnica descrita por MERCHANT (1958). A recomendação de se extrair toda a água não foi seguida; valores de 55 m²/g (MERCHANT, 1958) e 3,30 m²/g (FAN, LEE & BEARDMORE, 1980) foram encontrados para a mesma polpa sulfite. Após a moagem, os valores da área superficial são ainda menores, e oscilam em torno de 1,5 m²/g.

É possível que ocorra uma diminuição na

área superficial da celulose moída, se for pensado que os po-
ros e capilares das fibras são destruídos, havendo a forma-
ção de agregados mais densamente empacotados. FAN, LEE &
BEARDMORE (1980) concluem que, da forma como foi medido, não
há qualquer correlação entre a área superficial específica e
a velocidade e extensão de hidrólise. MARCHESSAULT (1978) su-
gere que o fator de maior importância é a capacidade de in-
chamento da estrutura da celulose.

1.3 Mecanoquímica

1.3.1 Mecanoquímica da Celulose (CASALE & PORTER, 1979)

O efeito primário da ação de uma força mecânica em macromoléculas é a quebra de ligação química.

Está bem estabelecido que ocorre clivagem em polímeros viscoelásticos, durante a mastigação, moagem e extrusão, em fibras, por cominuição e moagem e em soluções poliméricas por irradiação ultrasônica, agitação a alta velocidade seguida de extrusão, ciclos de congelamento e descongelamento e descargas elétricas de alta voltagem.

A quebra da macromolécula é provavelmente possível pela localização de energia mecânica em um ponto específico da cadeia, o que conduz ao aparecimento de forças que superam a força de ligação covalente (CERESA, 1962).

1.3.1.1 Mecanismo

A ação mecanoquímica durante a moagem vibratória da celulose foi descrita pela primeira vez por STEURER & HESS (1944).

A exclusão de um mecanismo oxidativo para a quebra da cadeia foi possível devido a pequena variação no teor de grupos carboxila; também a espectroscopia de infravermelho não mostrou bandas de absorção para o C=O do grupo carboxila ($5,75\mu$) (FORZIATI, STONE, ROWEN & APPEL, 1950; GROHN, 1958).

A hidrólise foi afastada como mecanismo porque a velocidade com que a quebra ocorre independe da tem

peratura entre 0 e 90°C, e as reações hidrolíticas apresentam coeficiente de temperatura elevado (HESS, STEURER & FROMM, 1941).

A explicação mais aceita é que a clivagem é causada estritamente por energia mecânica (CERESA, 1962; SIMIONESCU & VASILIU-OPREA, 1968; BUTYAGIN, 1963; McBURNEY, 1954; STEURER & HESS, 1944; HOWSMON & MARCHESSAULT, 1959).

As energias requeridas para quebrar as ligações C-C e C-O são da mesma ordem de grandeza (80-90 kcal/mol). ASSARSSON, LINDBERG & THEANDER (1959), através da análise dos álcoois obtidos por redução, hidrólise e cromatografia dos produtos de moagem, mostraram que ambas as ligações são clivadas. As medidas (semiquantitativas) sugerem que a ligação C-O é mais fácil de quebrar que as ligações C-C.

A ação mecânica pode ocorrer com formação de íons, radicais livres ou uma mistura dos dois. A energia requerida para cisão heterolítica é maior que para a homolítica, e não há, até o momento, comprovação experimental da existência de macroíons formados mecanicamente.

A moagem de celulose em presença de aceptores radicalares (NO, I₂, O₂) mostrou conclusivamente que a quebra se dá com formação de radicais livres. Esses aceptores dificultam a reação de recombinação, ligando-se aos terminais de cadeia e causando um aumento na velocidade de deposição.

A ligação de NO à celulose foi comprovada por espectroscopia de infravermelho, através da banda carac-

terística de $-C-N=O$ a 1400 cm^{-1} ; o nitrogênio foi dosado pelo método Kjeldahl (SIMIONESCU & VASILIU-OPREA, 1968). OTT (1964) quantificou a incorporação de I^{131} durante a moagem, efetuada em tetracloreto de carbono e ciclohexano como agentes dispersantes.

Outra demonstração indireta do caráter radicalar da quebra mecânica é a possibilidade de efetuar reações de interpolimerização. SIMIONESCU & VASILIU-OPREA (1968), moeram carboximetil celulose e cloreto de polivinila, e os produtos de moagem foram analisados por solubilização diferencial e através do aparecimento de novas bandas nos espectros de infravermelho. Eles descrevem o processo como sendo muito intrincado devido às várias estruturas que podem surgir por ação recíproca dos macrorradicais dos homopolímeros com os diversos grupos substituintes.

A comprovação direta da formação de radicais livres durante a ação mecânica sobre celulose é feita com medidas de ressonância paramagnética do elétron (item 1.4.2 desta dissertação).

A presença de macroíons não pode ser verificada com a mesma facilidade, mas a formulação de um mecanismo heterolítico ocorrendo em paralelo (ao homolítico) não pode ser descartada.

1.3.1.2 Extensão e Velocidade da Ação Mecânica

Existe um grau de polimerização médio mínimo que é alcançado após moagem prolongada (STEURER & HESS, 1944; GROHN, 1958).

Esse limite independe da estrutura fina do material de partida: é o mesmo para celulosas tão diversas do ponto de vista morfológico, quanto algodão, polpa de madeira, fibra mercerizada e viscose. Independe também da presença de aceptores, o que serviu a OTT (1964) como prova de que tais aceptores não promovem qualquer tipo de degradação secundária.

A extensão da quebra varia com o tipo de moinho, amplitude vibratória, densidade e peso das esferas. GROHN (1958) comentou a necessidade de estudos sistemáticos sobre a influência de fatores mecânicos na moagem de celulose.

STEURER & HESS (1944) deram muita ênfase ao grau de polimerização limite, como sendo o menor pedaço possível de quebra. No entanto, medidas de viscosidade avaliam o grau de polimerização médio, e não pode ser excluída a hipótese de, com prolongada moagem, chegar-se até o monômero.

Pouca atenção tem sido dada para o significado da fração solúvel em água de celulose moída. Após quatro dias de moagem é possível solubilizar 0,5% do pó (ASSARSSON, LINDBERG & THEANDER, 1959) (moinho de ágata). Após 6 horas de moagem vibratória, CAULFIELD & MOORE (1974) solubilizaram 2% da celulose; 300 horas foram suficientes para GROHN (1958) dissolver um terço do material (moinho vibratório).

Na tabela 1.2 encontram-se valores de solubilidade de oligossacarídeos (TØNNESSEN & ELLEFSEN, 1971).

Tabela 1.2 - Solubilidade de oligossacarídeos (TØNNESEN & ELLEFSEN, 1971).

Oligossacarídeos	gramas por 100 g de solução (a)
β -D-glicose	50,8
Celobiose	13,3
Celotriose	11,7
Celotetrose	7,5
Celopentose	0,59
Celohexose	$\approx$ 1,0(b)
Celoheptose	$\approx$ 1,0
(a) valores a 25°C	
(b) valores em água quente	

Oligossacarídeos superiores podem ser considerados, para fins práticos, como tendo solubilidade nula. É razoável imaginar que a celulose dissolvida contenha pedaços de quebra muito inferiores ao grau de polimerização limite.

ASSARSON, LINDBERG & THEANDER (1959) reduziram a fração solubilizada com boroidreto e por cromatografia de papel foi possível evidenciar a presença de glucitol, celobitol e álcoois de oligossacarídeos superiores, ao lado de glucitóis com 3, 4 e 5 átomos de carbono. É possível que o grau de polimerização limite tenha o significado de um equilíbrio dinâmico entre quebra e recombinação de cadeia.

A velocidade da ação mecânica é drasticamente influenciada pela estrutura fina da celulose. A moagem da celulose quimicamente pura, em ausência de veículo dis-

persante, possibilita uma classificação baseada apenas na plasticidade inerente a cada ordenação lateral.

Regiões amorfas são deformáveis (plásticas), e a energia mecânica pode ser deslocada de modo a permitir que *movimento de cadeia* substitua a *quebra de cadeia*. A região cristalina pode ser definida como uma unidade de volume contendo um grupo de moléculas que se comportam como um bloco frente à aplicação de uma força externa.

Uma fibra com elevado grau de ordem, como o algodão, sofre ação mecânica a uma velocidade catorze vezes superior à viscosa, na primeira hora de moagem vibratória (a partir dos dados de SIMIONESCU & VASILIU-OPREA, 1969). LEOPOLD & MOULIK (1968) encontraram acentuada diferença na cinética de quebra da cadeia das polpas Kraft e sulfite de mesma origem. Informações sobre a estrutura fina das polpas foram obtidas por difração de raio-X, absorção de umidade e hidrólise ácida. A polpa Kraft contém cristallitos menores mas em maior número, que atuam como ligações cruzadas ao longo da estrutura, restringindo os movimentos das cadeias. Como consequência, essa polpa degrada duas vezes mais depressa que a sulfite.

1.3.1.3 Efeito da água

A água plasticiza a ação mecânica, quer esteja presente como umidade residual ou líquido dispersante as tabelas 1.3 e 1.4 mostram que o efeito é maior no segundo caso.

Tabela 1.3 - Efeito da umidade residual sobre a ação mecânica

tratamento, tipo de material e umidade	grau de polimerização			
	a seco		em água	
	inicial	final	inicial	final
polpa acondicionada a 58% UR; 150 h de moagem rotacional (1)	1200	528	1205	710
juncos, 4 h de moagem vibratória; 3,78% de umidade (2)	776	326	776	392
(1) HOWSMON & MARCHESSAULT (1959)				
(2) SIMIONESCU & VASILIU-OPREA (1968)				

Tabela 1.4 - Efeito da água sobre a ação mecânica

tratamento, tipo de material e umidade	grau de polimerização			
	a seco		em água	
	inicial	final	inicial	final
polpa Kraft delignificada; 10 h de moagem vibratória (1)	1520	128	1520	1160
polpa sulfite delignificada; 10 h de moagem vibratória (1)	1600	200	1600	1280
algodão; 23 h de batimento (2)	-	-	3000	1380
(1) LEOPOLD & MOULIK (1968)				
(2) WIJNMAN (1954)				

Se a moagem é feita em líquido dispersan-

te, a natureza da interação do líquido com a celulose é o fator principal que irá determinar a velocidade de quebra das macromolêculas. Assim, a ação mecânica em presença de benzeno é vinte vezes maior que em água (LEOPOLD & FUJII, 1965).

O efeito plasticizante implica que a energia mecânica seja dissipada na forma de movimento de cadeia. É esperado que esse movimento repercuta para os cristalitos com a consequente quebra de, no mínimo, suas superfícies (CAULFIELD & STEFFES, 1969). No entanto, a *cristalinidade da celulose moída em água altera-se muito pouco, mesmo após 50 horas de moagem* (LEOPOLD & MOULIK, 1968).

As forças envolvidas no batimento, aproximadamente aquelas da moagem vibratória, são suficientes para causar contusão, amaciamento e fibrilação da celulose, e deveriam ser suficientes para promover decristalização. WIJMNAM (1954) mostrou que há uma redução no tamanho médio dos cristalitos quando o algodão é submetido a batimento em água, sem uma correspondente redução na cristalinidade total. É possível que a ocorrência de dano no retículo seja seguida por recristalização (CAULFIELD & STEFFES, 1969).

A presença de umidade residual não impede a obtenção de celulose amorfa por moagem. Ao contrário, HOWSMON & MARCHESSAULT (1959) verificaram que a velocidade de quebra da rede é acelerada se a polpa for previamente equilibrada em atmosfera de umidade relativa igual a 58%. A explicação baseia-se no fato que a moagem implica na criação de novas superfícies, e a interface vapor-sólido tem energia

mais baixa que a interface sólido-ar.

1.3.1.4 Efeito da Porcelana

A extensão da quebra de cadeia independe da temperatura de moagem entre 0 e 30°C; o fato serviu como justificativa para a exclusão de um mecanismo hidrolítico (item 1.3.1.1 desta dissertação).

No entanto, o aumento da temperatura ocasiona uma queda acentuada na viscosidade da celulose moída. HESS, STEURER & FROMM (1942) preocuparam-se em corrigir os resultados para o desprendimento de porcelana, que aumenta à temperaturas crescentes. A correção foi feita a partir dos dados do gráfico 1.5, que mostra a variação da viscosidade com a porcentagem de pó de porcelana adicionada.

Figura 1.5 - Variação da viscosidade da celulose com a porcentagem de porcelana (8 horas de moagem vibratória a 20°C)(HESS, STEURER E FROMM (1942)).

A tabela 1.5 apresenta os resultados de HESS, STEURER & FROMM (1942). Os autores concluem que a de-

pendência da temperatura é muito pequena e o aumento na velocidade de quebra deve ser relacionado ao pó de porcelana desprendido por moagem vibratória.

Tabela 1.5 - Variação da viscosidade com a temperatura (HESS, STEURER & FROMM, 1942).

temperatura da moagem ($^{\circ}\text{C}$)	% porcelana na amostra	$ \eta $	$ \eta $ corrigido
(0)* 12	5,9	1,22	1,42
(20) 32	5,6	1,10	1,30
(40) 52	15,8	0,95	1,35
(65) 77	17,5	0,80	1,24
(90) 102	20,2	0,65	1,12
* Temperatura externa			

1.3.2 Mecanoquímica de sólidos inorgânicos

A intensa fragmentação mecânica de sólidos inorgânicos como negro de fumo, grafite, quartzo, origina superfícies com falhas, livres da usual camada de adsorção. Essas superfícies são particularmente reativas devido à existência de centros ativos do tipo iônico e radicalar (KARGIN & PLATE, 1961; CERESA, 1962).

A presença de radicais livres foi detectada por medidas de ressonância paramagnética de elétron e pela capacidade, dessas superfícies, de iniciar a polimerização de monômeros vinílicos (BUTYAGIN, BERLIN & KALMANSON, 1959). O tempo de vida desses radicais é suficiente para que a dispersão de, por exemplo, quartzo, possa ser feita separadamente e estocada em atmosfera inerte.

No caso de sólido moído ser usado como iniciador, o rendimento do polímero depende do tempo de desintegração e da quantidade relativa entre os sólidos inorgânicos e o monômero (PLATE, PROKOPENKO & KARGIN, 1959). Quando foi usado quartzo como fonte de sítios radicalares, o polímero isolado continha sílica ligada; os fragmentos de quartzo residuais apresentaram polímeros enxertados nas superfícies onde ocorreu fratura. KARGIN & PLATE (1961) denominaram o fato de "organofilização de superfícies".

Muitos sais e óxidos que nunca atuaram como iniciadores na forma completamente cristalina, podem iniciar polimerização se submetidos a intensa fragmentação mecânica. Em cristais iônicos (NaCl , NH_4Cl , BaSO_4 e CaFe), ainda segundo KARGIN & PLATE (1959), parece ocorrer iniciação por elêtrons desemparelhados, e nesses casos os homopolímeros não contêm traços de metais.

1.4 Radicais Livres

1.4.1 Radicais livres iniciados por aquecimento (a partir de KILZER, 1971)

A temperatura acima de 120°C , a instabilidade da celulose e muitos de seus derivados se torna progressivamente evidente. A decomposição é acompanhada pelo aparecimento de substâncias menores, voláteis; acima de 300°C , a celulose pode ser carbonizada (ou grafitizada).

Os produtos formados na degradação térmica variam de pequenas moléculas (hidrogênio, metano e dióxido de carbono), carboidratos de tamanhos intermediários, álcoois e carboxilas, até levoglucosan e outros anidridos, iguais em peso ao monômero da celulose. O número total de substâncias isoladas e identificadas é cerca de 50.

Há dois processos que competem pelas unidades dos monômeros; a quebra da cadeia e a carbonização. A depolimerização origina anidridos, como levoglucosan, que tem esse nome devido à rotação ótica e à pronta hidrólise até glicose (Figura 1.6).

Figura 1.6 - Formação de levoglucosan (KILZER, 1971)

Foi postulado que a etapa crítica na formação de levoglucosan é a quebra da ligação 1,4-glicosídica (CONRAD, TRIPP & MARES, 1951). A significativa concentração de radicais livres que acompanha o aquecimento da celulose

serve como suporte para a formação de um mecanismo homolítico para a quebra da cadeia. Dados experimentais de ARTHUR & HINOJOSA (1966) indicam que radicais livres são de fato termicamente iniciados no algodão. O efeito da temperatura e tempo de aquecimento é mostrado na Figura 1.7. Até 225°C a concentração de radicais aumenta linearmente com o tempo, e após 250°C o aumento é exponencial. Segundo os autores, a alta concentração de radicais livres, particularmente entre 250-300°C, é indicativa que foi iniciada uma reação em cadeia.

Figura 1.7 - Efeito da temperatura e tempo de aquecimento na iniciação de radicais livres no algodão (ARTHUR & HINOJOSA, 1966)

ARTHUR & HINOJOSA (1966) documentaram a estabilidade desses radicais. Se as amostras aquecidas são resfriadas até a temperatura ambiente, alguma recombinação o corre, como evidenciado por ressonância paramagnética do elê tron, havendo em seguida pouca ou nenhuma variação do sinal

com o tempo. ERMOLENKO, SVIRIDOVA & POTAPOVICH (1966) também descrevem uma inesperada estabilidade: após aquecimento a 200, 300 e 400°C, a linha da RPE não é afetada por exposição das amostras a oxigênio. Os autores explicam a estabilidade dos radicais assumindo que eles são inacessíveis por estarem aprisionados no interior da estrutura da celulose, de forma que as moléculas do oxigênio não podem alcançá-los. O fato de ser possível observar radicais após o resfriamento das amostras, significa que a recombinação foi impedida de alguma forma. A formação autocatalítica de radicais a 250°C e temperaturas mais altas pode ser causada pela liberação de radicais aprisionados, devido ao aumento da mobilidade de segmentos de polímero e terminais moleculares, recentemente formados. Esses radicais podem fazer parte de uma rápida depolimerização por remoção sequencial de elementos de cadeia (unzipping).

1.4.2 Radicais livres iniciados por ação mecânica

BUTYAGIN (1961) verificou a formação de intermediários ativos por RPE durante a quebra mecânica de carboximetilcelulose. KLEINERT & MORTON (1962) usaram espectroscopia de RPE para detectar radicais livres em madeira submetida a moagem; a concentração de radicais aumenta com a diminuição do tamanho da partícula. URBAŇSKY (1967) registrou o espectro de RPE de celulose triturada em almofariz de ágata; a água promove supressão dos radicais formados; OTT (1964) detectou uma linha complexa quando a celulose foi moída (moinho de aço) durante 36 horas; o sinal é perdido após 8 dias

de exposição ao ar.

1.5 Objetivos

A energia gasta na operação de moagem é parcialmente perdida quando a celulose é colocada em água e espontaneamente reordenada por recristalização.

O objetivo deste trabalho é a verificação da possibilidade de enxertia de monômeros e de polímeros hidrofílicos na celulose, com a finalidade de evitar a recristalização e aumentar a capacidade de absorção de água.

Objetivos específicos nesse sentido são os seguintes:

1. Verificação da ocorrência de cisão homolítica por tratamento da celulose em moinho de bolas.
2. Verificação da possibilidade de copolimerização mecanoquímica da celulose com monômeros vinílicos (acrilamida), azul de dextrana, amido, sacarose e maltose.
3. Estudo da influência da enxertia na velocidade e extensão da hidrólise enzimática da celulose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Mecanoquímica

- Papel de filtro Schleicher & Schüll da Selecta, com 95% de alfa-celulose, diâmetros de 90 e 150 mm, e 10^{-4} g de cinzas/g de papel, foi a única fonte de celulose usada em todo o trabalho.

- Um moinho rotacional de porcelana da NORTON Co. AKRON, com tambor de 2 litros de capacidade, operando a 100 rpm, foi usado nos experimentos descritos em 2.2 e 2.3 (enxertia e radicais livres). A carga consistiu de 5 esferas também de porcelana, com diâmetro aproximado de 4 cm (peso total 350 g) e 14 folhas de papel de filtro de diâmetro 90mm, pesando aproximadamente 7 g.

- Quatro moinhos de porcelana CHIAROTTI, com 3,5 kg de esferas de diversos diâmetros, variando de 1 a 2,5cm, foram usados para os experimentos de hidrólise enzimática. Os tambores, com capacidade de 5 litros, operaram a 33 rpm.

- 14 folhas de papel de filtro de diâmetro igual a 150 mm, pesando cerca de 20 g, completaram a carga usada em todos os experimentos de hidrólise enzimática.

2.1.1 Preparação do moinho

Entre cada ensaio, os moinhos funcionaram com uma solução de NaOH a 10%, durante cerca de 15 minutos. A seguir, foram lavados várias vezes com água destilada e se

cos em estufa a 105°C por 24 horas.

2.1.2 Condições de umidade no interior do moinho

- Condicionamento para equilíbrio com a umidade do ar: ao sair da estufa, o moinho foi deixado esfriar destampado.

- Condicionamento para uma atmosfera seca: ao sair da estufa, o moinho foi tampado e deixado esfriar. A tampa possui um anel de borracha móvel, que é pressionado entre as superfícies de porcelana, de modo a permitir excelente vedação.

- Alternativa para se obterem condições secas: um bēquer com cerca de 250 mL de H_2SO_4 concentrado é colocado dentro do moinho, sobre as esferas, e em seguida o moinho é tampado. Após 24 horas, o bēquer é rapidamente retirado de forma a minimizar a contaminação com a umidade atmosférica.

- Condicionamento para atmosfera saturada de umidade: o moinho é deixado equilibrar por 24 horas com 250 mL de água contida em um bēquer no seu interior. Após remoção do bēquer, o moinho é rapidamente tampado.

2.2 Evidência da Formação de Radicais Livres - Ressonância Paramagnética do Elêtron

Foi usado um espectrômetro Varian, modelo E-4, operando na faixa de 9Ghz com celas cilíndricas de quartzo (diâmetro igual a 3,5 mm). O critério para a escolha dos ajustes é evitar a distorção nos espectros. O valor da potência foi constante e igual a 10 mW. A amplitude de modulação foi fixada em 1,25 G e a constante de tempo, 1 segundo. Os tempos de varredura foram geralmente de 8 a 16 minutos. A cubeta esteve sempre cheia de pó empacotado, de forma a preencher toda a largura da cavidade. Todos os espectros foram registrados a temperatura ambiente.

2.3 Ensaio de Enxertia

Os reagentes utilizados nos ensaios de enxertia de celulose foram os seguintes: sacarose (^{14}C) da Shwarz-Mann, Dextran Blue 2000 da Sigma e acrilamida Aldrich.

A sacarose tinha atividade específica de 480 curies/mol. Determinação de radioatividade foi feita usando solução de 2,5-difeniloxazol (4 g) e 2.2'-p-fenilenbis (5-feniloxazol) (0,1 g) em tolueno (1 l) em um contador de cintilação Beckman LS-250.

A determinação de acrilamida enxertada em celulose foi feita por dosagem de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (LILLEVIK, 1970).

2.4 Hidrólise Enzimática

MAXAZYME CL (Gist Brocades NV) é um preparado em forma de pó, obtido de *Trichoderma viride*, que hidroliza diferentes tipos de substratos celulósicos. É ativo na faixa de pH de 3,5 a 6,5. A temperatura ótima está entre 45-50°C. Toda a fração ativa é solúvel em água, e é perdida por aquecimento acima de 60°C (especificações do fabricante).

A atividade sobre papel de filtro foi estimada pelo método de MANDELS, HONTZ E NYSTRON (1974), de modo a ajustar a concentração enzimática na faixa de atividade dos filtrados de cultura de *T.viride* usada por esses autores (para avaliar a eficácia de diversos pré-tratamentos).

A hidrólise enzimática foi seguida medindo-se os açúcares redutores de uma dispersão com 5% de substrato, incubada a 50°C, pH 4,8 e agitação a 200 rpm em um frasco Erlenmeyer de 250ml (MANDELS, HONTZ & NYSTRON, 1974). A porcentagem de sacarificação é igual à concentração de redutores multiplicada pelo fator 1,8. Os açúcares redutores foram dosados colorimetricamente pelo método do DNS, sendo a glicose usada como padrão.

3. RESULTADOS

3.1 Evidências da Formação de Radicais Livres - Ressonância Paramagnética de Elêtrons (RPE)

Foram obtidos preliminarmente os espectros de RPE de amostras de celulose moída, com o objetivo de se determinar a formação de radicais livres em decorrência da moagem. Dificuldades de reproduzir e interpretar os espectros obtidos mostraram a necessidade de verificar o aparecimento de sinal de RPE na própria porcelana do moinho, em decorrência da pulverização sofrida durante a moagem.

3.1.1 Comportamento da porcelana

3.1.1.1 Aparecimento de sinal RPE intenso

Fazendo-se girar o moinho com cinco esferas de porcelana, após a preparação descrita em 2.1.1, obtem-se um pó marrom-escuro, que mostra o espectro de RPE apresentado na figura 3.1. O espectro da mesma amostra, após dois meses, não mostrou alteração. Aquecimento do pó a 900°C , em presença do ar, provoca desaparecimento de sua coloração e redução do sinal de RPE abaixo do nível detectável nas condições de trabalho usadas.

A maioria das esferas de porcelana apresenta pequenos pontos escuros, provavelmente alguma impureza metálica. O desprendimento desse material durante a moagem poderia dar origem à forte coloração do pó. Foram selecionadas bolas com grande número de pontos pretos e, após 24 ho-

Figura 3.1 - Sinal de porcelana; ganho = 8×10^2

ras de exposição na mufla a 900°C , não foi possível observar qualquer alteração na aparência das mesmas.

3.1.1.2 Condições para o aparecimento de um sinal de fraca intensidade

O moinho foi colocado em funcionamento após sucessivos ciclos de preparação, conforme o item 2.1.1, com o objetivo de extrair ao máximo a celulose residual presente nos poros. A figura 3.2 mostra um espectro típico do pó obtido nessas condições. O espectro de pó de porcelana obtido é também muito estável, e após dois meses não foi possível medir qualquer variação na intensidade da ressonância.

O decaimento da linha após duas exposições consecutivas do pó a $400-500^{\circ}\text{C}$ por um período de 1 hora cada, pode ser visto na figura 3.3. Após 6 horas a 900°C , o sinal desaparece.

Figura 3.2 - Sinal fraco de porcelana; ganho = 8×10^3

Figura 3.3 - Decaimento da linha fraca de porcelana; ganho = 8×10^3

3.1.1.3 Influência da umidade no comportamento da porcelana

Quando a atmosfera do moinho é saturada com umidade (cf. MATERIAIS E MÉTODOS, 2.1.2), o pó recuperado é branco, e não apresenta ressonância no campo habitualmente varrido.

Em todas as outras condições não foi possível observar diferenças significativas: com o moinho previamente seco ou em equilíbrio com a umidade do ar.

3.1.2 Comportamento da celulose

3.1.2.1 Condições para o aparecimento apenas da linha de celulose

Se a moagem é efetuada em ausência de umidade (cf. MATERIAIS E MÉTODOS, 2.1.2), após 24 horas as folhas saem com pouco dano, cobertas de um material feltrado, com nenhum pó presente. As partículas menores aparentam estar eletrizadas e se atraem, formando aglomerados. O papel residual e as partículas não apresentaram ressonância paramagnética.

Com 70 horas de moagem é possível obter um pó branco. O espectro desse pó está mostrado na figura 3.4 (a); após 24 horas de exposição ao ar, diminui a intensidade do sinal (Figura 3.4(b)).

Figura 3.4 - Sinal atribuído à celulose; ganho = 8×10^3

3.1.2.2 Condições para obtenção de espectros mostrando sinais de celulose e porcelana superpostos

A superposição espectral ocorre em todas as demais situações alternativas da moagem, a menos da descrita no item 3.1.2.1. Foram selecionados e serão discutidos os espectros nos quais a banda de celulose é mais nítida.

A figura 3.5 apresenta a linha obtida após a celulose e o moinho serem aquecidos a 105°C , por 24 horas, e deixados em equilíbrio com a umidade do ar; a duração da moagem foi de 24 horas.

A moagem (24 horas) em atmosfera de nitrogênio origina o sinal (a) da figura 3.6; a diminuição da intensidade da linha traçada quatro dias após a primeira, pode ser vista em (b).

Figura 3.5 - Superposição das linhas de celulose e porcelana;
ganho = 8×10^3 . Moagem efetuada após aquecimento a 105°C por 24 horas.

Figura 3.6 - Superposição espectral de celulose e porcelana;
ganho = 8×10^3 . Moagem efetuada em atmosfera de nitrogênio

Na figura 3.7 é possível acompanhar a diminuição da banda de celulose 25 minutos (b), 90 minutos (c) e 7 dias (d) após o traçado da primeira linha (a). O tempo de moagem foi de 9 dias.

Figura 3.7 - Superposição espectral de celulose e porcelana.
Põ obtido após 9 dias de moagem.

A amostra moída durante 9 dias foi calcinada a 400°C por 2 horas, e o espectro obtido por RPE para o p̄o residual é semelhante ao obtido conforme o item 3.1.1, sendo mais intenso (para o mesmo volume de p̄o) que o espectro do material não calcinado. Isto permite inferir que o sinal

por unidade de volume de pó de porcelana é muito mais intenso que o sinal por unidade de volume de pó de porcelana e celulose, juntos.

3.1.3 Conclusões

Porcelana

- Porcelana moída apresenta sinal de RPE.
- O aparecimento de uma linha de intensidade mais forte depende da presença de celulose (residual ou não).
- A linha de porcelana é extremamente estável.
- Cor e sinal desaparecem por aquecimento a 900°C.

Celulose

- A linha de celulose é obtida após 70 horas de moagem em condições secas.
- Em todas as outras condições, ocorre superposição espectral de sinais atribuíveis a porcelana e celulose.
- O sinal de celulose diminui de intensidade mais rapidamente que o sinal de porcelana.

3.2 Enxertia

3.2.1 Evidências qualitativas de enxertia

Moeram-se 7 g de celulose com 1 g de amido por 24 horas, e o pó recuperado do tambor foi adicionado a 2 litros de água a 70°C, aí permanecendo por 15 ou 20 minutos, sob agitação mecânica. Seguiu-se filtração em vidro sinterizado, com a retirada de uma alíquota. A sequência foi repetida 4 vezes. O teste do resíduo sólido com Solução de Lugol deu origem a uma intensa coloração azul, indicando a presença de amido *em todas as amostras*. Foi possível evidenciar amido apenas na primeira água de lavagem. O controle, efetuado com celulose em pó, apresentou uma coloração castanho clara.

Celulose encharcada com uma solução de azul de dextrana foi seca até peso constante em dessecador, sobre sílica gel. As folhas foram moídas por 24 horas, e o pó azul recuperado foi submetido aos seguintes tratamentos.

- extrações sucessivas, cada uma com 300 ml de solução aquosa; foi possível observar coloração apenas no primeiro filtrado.
- tratamento igual ao anterior, com mesmo resultado, porém usando solução de NaOH a 20%.
- extração em Soxhlet com água por 10 dias, acompanhada com medidas diárias da transmitância do extrato, que não foi renovado. As leituras foram feitas em 620 nm, comprimento de onda correspondente ao máximo do espectro de absorção do azul de dextrana em meio aquoso (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Extrato aquoso de celulose moída com azul de dextrana. Variação da % de Transmitância com o tempo de extração.

dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	8º	9º	10º
% T	76	73	74	72,5	71	69	68,5	67,5	68

3.2.2 Avaliação quantitativa de enxertia

3.2.2.1 Acrilamida

14 folhas de papel de filtro foram encharcadas com uma solução 1% de acrilamida e a seguir deixadas em dessecador, com sílica gel, até peso constante. A moagem durou 24 horas e foi efetuada em presença de nitrogênio.

O pó foi submetido a intensa agitação com 2 ℓ de água destilada fria e em seguida filtrado. A operação foi repetida quatro vezes, e o material retido no filtro de vidro sinterizado foi seco até peso constante em dessecador com sílica gel. Após a retirada de uma alíquota, o material foi novamente lavado com quatro porções de água de 2 ℓ cada (2a. lavagem), e assim sucessivamente até a 4a. lavagem. Todo o procedimento descrito acima foi repetido usando-se soluções de acrilamida de concentrações iguais a 3 e 5%, no encharcamento do papel. A variação do teor de nitrogênio determinado nos sólidos pode ser vista na tabela 3.2a.

Os controles foram efetuados com a adição de soluções 1,3 e 5% de acrilamida à celulose previamente moída. Após 15 minutos de agitação mecânica, cada suspensão

foi filtrada em vidro sinterizado e seca em dessecador. Os pões foram lavados segundo o mesmo procedimento, e os resultados das dosagens de nitrogênio podem ser vistos na tabela 3.2b.

Tabela 3.2a - Variação do teor de nitrogênio nas amostras moídas com acrilamida.

% Acrilamida	% NITROGÊNIO		
	1	2	3
pão ao sair do moinho	0,36	1,2	2,08
1a. lavagem	0,12	0,38	0,66
2a. lavagem	0,11	0,34	0,67
3a. lavagem	0,11	0,37	0,65

Tabela 3.2b - Variação do teor de nitrogênio nos controles encharcados com acrilamida

% Acrilamida	% NITROGÊNIO		
	1	2	3
pão seco	0,08	0,15	0,31
1a. lavagem	0,02	0,06	0,10
2a. lavagem	0,01	-	0,06
3a. lavagem	0,02	-	0,03

3.2.2.2 ^{14}C Sacarose

4 folhas de papel de filtro foram embebidas com 5 ml de uma solução contendo ^{14}C sacarose. Os pa-

péis foram secos a vácuo até peso constante e a seguir moídos durante 7 dias.

Controle: 4 folhas de papel de filtro foram moídas por 7 dias e o material recuperado do moinho foi encharcado com 5 ml da mesma solução de ^{14}C sacarose indicada acima, e secos a vácuo até peso constante.

1 g de amostra e 1 g do controle foram extraídas em Soxhlet com 250 ml de água por cerca de 50 horas cada. Os resultados encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - cps/g antes e após a extração

	pulsos por segundo por grama (cps/g)	
	amostra	controle
antes da extração	3120	12400
após a extração	48	3

3.3 Hidrólise Enzimática

A metodologia desenvolvida por MANDELS, HONTZ E NYSTROM (1974) foi usada sem modificações.

Foram efetuados alguns experimentos para verificar a possibilidade de reproduzir resultados a partir de substratos de composição mal definida e enzimas produzidas de formas diversas.

Papel de imprensa rasgado e moído 24 horas foi usado como padrão; atividade da MAXAZYME CL foi estimada em 0,14 unidades de papel de filtro/g; concentração igual a 0,6%.

Os resultados estão em (a) da tabela 3.4 comparados com os de MANDELS, HONTZ & NYSTROM (1974), em (b).

Tabela 3.4 - Variação da porcentagem de sacarificação com o tempo

Substrato		% Sacarificação		
		4 horas	24 horas	48 horas
Jornal rasgado	(a)	12,3	23,9	27,0
	(b)	12,4	23,6	27,2
Jornal moído	(a)	35,1	46,8	48,8
	(b)	28,5	42,3	46,8

3.3.1 - Moagem de celulose em presença de diversos materiais: efeito sobre a extensão e a velocidade da hidrólise enzimática.

Os ensaios tiveram em comum a duração da moagem, igual a 24 horas; o moinho carregado com 14 folhas de papel de filtro de diâmetro igual a 150 mm (cerca de 20g); a massa seca da celulose nos ensaios de sacarificação igual a 5 g.

Salvo especificação em contrário, a celulose e o moinho foram equilibrados com a umidade do ar. Algumas amostras foram lavadas com 3 adições sucessivas de 2 l de água, agitação mecânica e filtração em vidro sinterizado.

Nos ensaios em que o material é seco até peso constante, usa-se dessecador a vácuo, com sílica gel. Os resultados encontram-se na tabela 3.5.

O conjunto agrupado em I corresponde à celulose moída na ausência de aditivos.

Nos ensaios números:

- 1 e 2: a celulose foi lavada e secada até peso constante;
- 3: a celulose moída foi adicionada a 100 ml de uma solução saturada de sacarose, juntamente com 70g de pérolas de vidro (diâmetro variando de 2 a 3 mm) e submetida a agitação mecânica por 4 horas. Após filtração em vidro sinterizado, as pérolas foram removidas e a celulose secada até peso constante;
- 4: a solução saturada de sacarose foi substituída por água, adotando-se o mesmo procedimento do ensaio 3;
- 5: a celulose foi secada até peso constante;
- 6 a 10: a celulose foi lavada e mantida úmida;
- 9: anteriormente à moagem, um bēquer contendo H_2SO_4

Tabela 3.5 - % de sacarificação de celulose incubada a 50°C, pH = 4,8 em solução 0,6% de MAXAZYME CL; efeito de aditivos e/ou aquecimento.

	ensaio nº	% Sacarificação				
		1 h	3 h	5 h	7 h	24 h
I celulose	1	12,2	25,0	33,2	40,0	
	2	15,0	29,1	36,3	43,0	
	3	12,1	26,0	35,9	42,8	
	4	12,7	26,3	35,7	42,3	
	5	15,0	28,0	36,7	43,8	
	6	11,6	25,8	32,3	38,3	
	7	11,7	24,3	32,0	39,4	
	8	14,3	27,2	33,5	35,8	
	9	12,9	25,4	30,5	37,0	61,0
	10	10,0	28,0	35,0	40,0	62,0
II celulose e açúcares	11	16,8	34,5	41,7	47,7	
	12	16,2	33,4	41,7	48,1	
	13	16,0	34,5	40,7	48,3	
	14	13,0	35,0	44,2	-	69,0
	15	19,5	34,8	43,5	50,7	
	16	23,0	39,0	44,8	51,0	72,0
III celulose e sílica-gel	17	21,5	36,8	43,3	47,1	
IV celulose e acrilamida	18	16,5	28,0	34,0	39,6	
V celulose aquecida a 250°C por 40 min	19	19,7	34,4	40,0	47,6	78,4
	20	18,0	40,9	49,2	55,5	75,6

concentrado foi deixado por 24 horas no interior do moinho, carregado com a celulose.

Obs.: Foi feito um controle com 5 g de sacarose substituindo a celulose. A ausência de redutores após 4 horas de incubação mostrou conclusivamente que a MAXAZYME CL não tem contaminação de invertase.

O conjunto agrupado em II corresponde aos resultados obtidos com celulose moída em presença de dissacarídeos.

Nos ensaios números:

- 11: a celulose foi moída com 1,5 g de sacarose e 1,5 g de maltose;
- 12: o moinho foi carregado com a celulose e 3 g de maltose, postos para equilibrar com água contida em um bēquer, por 24 horas;
- 13: a celulose foi moída juntamente com 3 g de maltose, após 24 horas de permanência no interior do moinho ao lado de um bēquer contendo H_2SO_4 concentrado;
- 14: as folhas de celulose foram embebidas com solução de maltose de concentração suficiente para dar 3 g totais de açúcar. A seguir, o material foi secado e moído;
- 15 e 16: moeu-se celulose com 3 g de sacarose.

Em III estão os resultados para celulose moída com sílica-gel.

ensaio nº 17: celulose moída com 3 g de sílica-gel.

Os resultados do grupo IV correspondem à

celulose moída com acrilamida.

ensaio nº 18: as folhas de papel de filtro foram encharcadas com solução a 20% de acrilamida e secadas até peso constante. Após a moagem, o material recuperado foi lavado e novamente secado.

Em outro ensaio, 3 g de acrilamida sólida foram adicionadas à celulose. Após a moagem, os papéis saíram inteiros, praticamente sem nenhum dano, e recobertos com uma camada plástica, incolor. É provável que tenha havido polimerização de acrilamida por ação mecânica. A aparência dos papéis é muito semelhante à adquirida quando as folhas foram embebidas em solução de ácido poliacrílico de alta viscosidade, secadas e colocadas para moer. O material resultante não foi submetido à sacarificação.

Em outro grupo de ensaios, a celulose foi previamente aquecida e os resultados estão reunidos no grupo V.

ensaio nº 19: a celulose foi aquecida a 250°C por 40 minutos e resfriada em equilíbrio com a umidade do ar.

Após a moagem, o pó foi lavado e mantido úmido

ensaio nº 20: ensaio idêntico ao 19, a menos da adição de 3g de maltose, no momento da moagem.

Entre a 24a. e 72a. hora de sacarificação, as amostras 19 e 20 estavam transparentes, indicando uma solubilidade total da celulose, ao contrário das outras amostras onde, no mesmo intervalo de tempo, observou-se a presença de resíduos.

Obs.: Aquecimento de papel de filtro a 220-250°C por meia hora resulta um substrato extremamente resistente à hidrólise. Após 24 horas de sacarificação as folhas permanecem intactas.

3.3.2 - Conclusões

A adição de sacarose e/ou maltose durante a moagem de celulose aumenta a velocidade e a extensão da hidrólise, no mínimo em sua etapa inicial. Com a aplicação do teste de significância (usando t de Student), verifica-se que a possibilidade dos dados "II" da tabela 3.5 representarem a mesma população que os dados agrupados em "I", na 5a. hora de hidrólise, é menor do que 0,05%.

4. DISCUSSÃO

4.1 Aspectos Estruturais

4.1.1 Mecanoradicais

O processamento de celulose em moinho de bolas de porcelana leva ao aparecimento de espécies radiculares originárias da celulose e da própria porcelana. A linha de RPE obtida com porcelana exaustivamente lavada é cerca de 10 vezes mais fraca do que aquela obtida quando resíduos de moagens anteriores contaminam o moinho. A constatação desse fato sugere que se deva considerar uma possível interdependência entre os radicais formados por fratura da porcelana e aqueles formados por fratura direta das cadeias poliméricas.

Os resultados de HESS, STEURER E FROMM (1942) (item 1.3.1.4 desta Dissertação) mostraram que a adição de pó de porcelana no tambor do moinho aumenta a extensão da quebra das cadeias de celulose, para um mesmo tempo de moagem. Esse efeito é idêntico ao de aceptores radiculares. A contaminação das amostras com resíduos dos equipamentos já foi descrita na literatura. SIMIONESCU, VASILIU-OPREA e NEGULIANU (1978) submeteram monômeros vinílicos a moagem vibratória, e o metal desprendido das paredes e das esferas do moinho teve um papel catalítico, de forma que a polimerização foi conseguida sem nenhum aditivo especial (item 3.1.

2). A ligação química de ferro à cadeia polimérica foi demonstrada por espectroscopia Mossbauer, e os autores concluem que somente traços de pó metálico são distinguíveis como uma fase distinta do polímero.

Segundo SOMASUNDARAN & MOUDGIL (1979), a ação mecânica sobre sólidos inorgânicos origina camadas amorfas que são responsáveis pela formação de superfícies mais reativas. Tais camadas não mostram as propriedades cristalinas do interior do material. Por exemplo, a densidade do quartzo submetido a moagem diminui em função do tempo de tratamento. Cabe aqui mencionar a possibilidade da ocorrência de reações mecanoquímicas entre sólidos inorgânicos: LIN & SOMASUNDARAN (1972) observaram a formação de galena durante a moagem de massicote ou litargírio com enxofre.

KAUSCH (1978) descreve a formação de mecanoradicais por fratura das cadeias macromoleculares como um fato geral em polímeros. Os resultados desta dissertação mostram que os radicais livres presentes em celulose são relativamente estáveis, sendo o sinal perceptível até alguns dias após a moagem, mesmo mantendo-se a celulose em presença do ar. São provavelmente radicais do tipo peroxo, e a sua presença é suficiente para justificar de modo qualitativo a ocorrência de posterior enxertia de celulose. HON (1979) mostrou conclusivamente a interação de moléculas de oxigênio com radicais livres obtidos por irradiação UV de celulose, a vácuo.

Reações secundárias dos macroradicais ob

tidos por ação mecânica podem ocasionar mudanças significativas na estrutura química, morfologia e outras propriedades da celulose. Essas espécies podem recombinar-se, reagir com outras moléculas presentes, e também atacar a própria cadeia da celulose, dando origem a uma estrutura reticulada que poderia ser altamente intumescível e pouco solúvel. Estranhamente, não há referências na literatura sobre essa última possibilidade.

Recentemente espécies radicalares foram detectadas por RPE durante a moagem de mono e dissacarídeos por HASEGAWA & TSUCHIDA (1977) e KUDO & HEUSINGER (1982). O fato é consistente com a observação de triboluminescência nesses compostos, e sugere que eles possam ser reagentes mecanoquímicos úteis no ataque a polímeros.

4.1.2 Enxertia e Hidrólise Enzimática

As reações mecanoquímicas ocorrem em polímeros sólidos como resultado da concentração de energia elástica em pequenos volumes ou em camadas superficiais finas, de acordo com mecanismos específicos. A energia desenvolvida desse modo é alta o suficiente para promover microquebras, das quais se originam radicais particularmente ativos, capazes de reagir com substâncias químicas apropriadas existentes no meio (SIMIONESCU, VASILIU-OPREA & NEGULIANU, 1978).

Resultados desta dissertação mostram evidências de enxertia de acrilamida, azul de dextrana, amido

e sacarose em celulose durante a moagem. Uma vez que a extração com solventes não pode ser considerada uma prova conclusiva de que a ligação química de fato ocorreu, faz-se necessário considerar explicações alternativas para a dificuldade de extração dos reagentes adicionados à celulose.

O conhecimento das forças envolvidas no tingimento das fibras de celulose por corantes diretos (corantes com alto poder de adsorção) pode ser de utilidade. Essas forças são exclusivamente de natureza física. A maioria dos corantes são compostos que possuem grupamentos solúveis em água, ligados a estruturas orgânicas insolúveis. Quase todos possuem grupos hidroxila, amino ou azo, capazes de formar pontes de hidrogênio. TROTMAN (1970) descreve evidências de que os grupos hidroxila da celulose exercem um papel significativo no processo de tingimento. Assim, quando a celulose é acetilada, cessa a afinidade por corantes diretos, que é restaurada quando os grupos acetila são hidrolisados. Porém, outros fatores devem ser levados em conta. Por exemplo, o aumento do número de anéis aromáticos ou de cadeias alifáticas não ramificadas na estrutura do corante pode causar um aumento muito maior na afinidade do que a introdução de grupos adicionais formadores de pontes.

A criação de uma interface água-hidrocarboneto requer o dispêndio de energia para separar as moléculas da água, pela quebra das pontes de hidrogênio. Portanto, a remoção das moléculas do corante causa uma diminuição da energia livre do sistema, e o estabelecimento do equilí-

brío requer a transferência de tinta, da solução para a fibra. TROTMAN (1970) comenta também a possibilidade do corante penetrar na estrutura de celulose em um estado de dispersão molecular, havendo a ocorrência de uma posterior agregação a um tamanho tal que as moléculas dificilmente podem migrar para a solução. CHAUDHURI, ARAVINDANATH & BETRABET (1981) mostraram as primeiras evidências diretas (por difração eletrônica) da presença de agregados cristalinos de corantes em fibras de celulose tingida. A maioria desses agregados estão presentes principalmente na superfície das microfibrilas. Se a presença de grupos apolares é necessária para a formação desses aglomerados, o comportamento descrito acima só explica a adsorção do azul de dextrana pela celulose (azul é um corante fenotiazínico, acoplado à dextrana por brometo de cianogênio).

KULSHERESHTHA, PATEL, BADDI & SRIVASTAVA (1977) efetuaram medidas de adsorção e dessorção de corantes diretos em fibras de algodão secas e naquelas retiradas diretamente do capulho (*permanentemente hidratadas*) para o banho de tingimento. Até o momento da abertura da semente, as fibras de algodão tem uma estrutura altamente porosa e uniforme, que colapsa por exposição ao ar. Sob condições nas quais o corante pode ser completamente removido do algodão, o algodão *permanentemente hidratado* retém cerca de 50 a 80% de tinta adsorvida. Os autores atribuem tais resultados ao fechamento irreversível dos poros durante a secagem.

A celulose moída também tem a estrutura

de morfologia grossa colapsada (item 4.1.3) que poderia explicar o aprisionamento de, por exemplo, azul de dextrana, amido e poliacrilamida. De qualquer forma, a confirmação da ocorrência de enxertia requer um maior número de evidências experimentais.

O presente trabalho mostra que a celulose modificada por moagem em presença de outras substâncias é, na maioria dos casos, significativamente mais suscetível a ataque enzimático do que celulose simplesmente moída. Os resultados estão de acordo com a perspectiva inicial, ou seja, a modificação mecanoquímica perturba a regularidade estrutural da celulose, introduzindo grupos volumosos que impedem ou dificultam a recristalização. Grupos substituintes ao longo da cadeia alteram drasticamente as propriedades da celulose. O efeito de tais grupos na higroscopia das fibras foi citado por CLARK (1978): celulose parcialmente metilada é completamente solúvel. Uma vez que o grupo metila não é hidrofílico, o efeito foi explicado unicamente pela quebra das pontes de hidrogênio que ligam as moléculas paralelas no cristal de celulose. Outro exemplo é dado por PHILLIP & SCHLEICHER (1979): a fixação de grupos cianoetila ao longo da cadeia ocasiona a dissolução de celulose em água, apesar da natureza hidrofóbica desses grupos.

É de se notar que a acrilamida, embora seja enxertada em quantidades apreciáveis, não afeta a cinética de hidrólise da celulose. Provavelmente a acrilamida forma cadeias relativamente longas, ligadas a poucos pontos

da celulose, sem afetar significativamente sua resposta ao complexo enzimático; além disso, as porcentagens de nitrogênio encontradas para as amostras após a extração com água podem ser mais altas que as correspondentes ao material efetivamente ligado. É sabido que os processos de enxertia resultam também na formação de homopolímeros, difíceis de separar completamente dos polímeros enxertados (ENDE & STANNETT, 1964; STANNETT & HOPFENBERG, 1971).

A hidrólise enzimática dos derivados solúveis de celulose foi usada para estudar os mecanismos da reação (REESE, 1962; KLOP & KOOIMAN, 1965 e WIRICK, 1968); para definir a disposição dos grupos substituintes ao longo da cadeia (BHATTACHARJEE & PERLIN, 1971); e na busca de alternativas tecnológicas de conversão do polissacarídeo (ZABRISKIE, QUTUBUDDIN & DOWNING, 1980). Os últimos autores relatam que a velocidade inicial de hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) é 4,1 vezes maior que o controle não substituído. No entanto, a reação é bloqueada após a sacarificação de apenas 23% de CMC, o que é explicado pelo fato de que *celulases somente hidrolisam ligações β -1-4 glicosídicas de unidades de anidroglicose adjacentes que não são substituídas*, e a frequência com que isso ocorre em derivados solúveis é baixa (REESE, 1962). Nenhum efeito comparável foi observado no presente trabalho, obviamente porque o grau de substituição é muito menor do que o necessário para dissolver o polímero.

4.1.3 Sobre a estrutura de poros e capilares

Os resultados desta dissertação mostram que o fato de celulose moída e lavada ser mantida úmida até o momento da sacarificação, ou ser secada ao ar (ou em slica gel), não altera o andamento da hidrôlise. A importância dessa constatação pode ser avaliada através da análise dos resultados de SADDLER, BROWNELL, CLERMONT & LEVITIN (1982): o tratamento de madeira por explosão a vapor seguido de extração com água e álcali diluído origina uma estrutura porosa com muitas falhas, pela remoção quase completa da hemicelulose e de um terço da lignina. O substrato assim obtido é excelente para a hidrôlise enzimática, apesar de não alterar a cristalinidade do material de partida: 44% de açúcares redutores são liberados após 2 horas de incubação. No entanto, quando as amostras são previamente secadas ao ar, o rendimento da hidrôlise é 50% menor do que no caso de serem mantidas úmidas. Segundo os autores, a secagem causa um colapso na estrutura de poros e capilares (corneificação).

O aquecimento de *fibras de celulose não moídas* exerce um efeito inibitório na hidrôlise enzimática (GHOSE & KOSTICK (1969) e resultados desta dissertação). Segundo os autores, há um progressivo aumento na perda da suscetibilidade com o aumento da temperatura de aquecimento, e a ação enzimática cessa completamente a temperaturas acima de 225°C. Esse efeito pode resultar da secagem das fibras a um nível tal que a sua reidratação se torna muito difícil. No entanto, a celulose moída e posteriormente aquecida

resulta em um substrato ainda melhor do que celulose apenas moída (GHOSE & KOSTICK, 1969).

Para a interpretação desses resultados, é necessário retomar alguns aspectos relevantes da estrutura da celulose: poros, capilares e corneificação.

COWLING & KIRK (1979) classificam os vazios capilares existentes nas fibras em duas categorias: *poros* e *capilares grossos*, tais como o lumen da célula e falhas na membrana, com tamanhos variando de $200 \text{ \AA}$ a 10μ . A área superficial total exposta por essas estruturas é aproximadamente $2 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{g}$ de madeira ou algodão; *poros* e *capilares de estrutura fina*, existentes nas paredes celulares, e originados pelo espaçamento das microfibrilas, e das moléculas na região amorfa. Quando madeira e algodão estão completamente saturados de água, os capilares da parede celular alcançam suas dimensões máximas. Alguns se expandem até cerca de $200 \text{ \AA}$ de diâmetro, mas a maioria é substancialmente menor. A área total exposta por tais estruturas é cerca de $3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{g}$.

Os poros e capilares das duas categorias existem a partir do momento da formação da fibra, e são preservados enquanto a fibra permanecer em água ou em outro meio capaz de causar inchamento, mas tendem a colapsar com a secagem, devido à flexibilidade das unidades do polímero (moléculas, microfibrilas, fibrilas).

Há evidências de que a moagem destrói a estrutura de poros e capilares (item 1.2.5). Medidas feitas

por RYU, LEE, TASSINARI & MACY (1982), utilizando o método estático de adsorção de nitrogênio em três diferentes pressões relativas, mostram que a moagem por compressão leva a uma diminuição na área superficial específica, quando comparada com aquela de controles não moídos. Provavelmente os poros e capilares destruídos são os de morfologia grossa. Concomitantemente com esse fato, ocorre a criação de áreas amorfas intumescíveis, ou seja, a criação de poros de estrutura fina, dos quais depende a capacidade de encharcamento em água. Assim, o resultado de um pré-tratamento que não altera a cristalinidade é extremamente dependente da presença de poros e capilares grossos, que devem servir como aberturas para as grandes moléculas do sistema enzimático; ou, em outras palavras, a influência da morfologia grossa na constante de velocidade de uma reação, aumenta significativamente com a diminuição do estado de inchamento da celulose no meio da reação, e também com o aumento do volume molar do reagente.

Foi visto que o comportamento da celulose amorfa (molda) difere daquele das fibras altamente cristalinas no que diz respeito à corneificação. Uma vez que o coeficiente de difusão de líquidos e vapores em polímeros depende essencialmente do volume livre existente entre as diversas unidades estruturais e da mobilidade dos segmentos de cadeia, é razoável supor que na celulose corneificada obtida por adensamento de um material cristalino, o volume livre seja muito inferior àquele de celulose amorfa se-

ca. É possível confirmar essa hipótese associando-se medidas de densidade com velocidade de difusão, para celulose de diversos graus de cristalinidade.

4.2 Aspectos Tecnológicos

A concentração de sólidos no reator de hidrólise é de fundamental importância para que a conversão de celulose a açúcares se torne economicamente viável. TASSINARI, MACY, SPANO & RYU (1980), discutem as vantagens de se usar substratos celulósicos em altas concentrações: o custo do capital para equipamentos pode ser reduzido e a produção de xaropes mais concentrados diminui o custo da concentração para aplicações subsequentes (por exemplo, a fermentação etílica).

KATZ & REESE (1968) efetuaram a moagem da polpa de madeira com aquecimento simultâneo (220°C), e com o pó obtido foi possível preparar suspensões de até 50%. O fato é surpreendente se for pensado que uma suspensão com 5% de celulose tratada com um agente inchante qualquer é uma massa sólida. Ainda segundo TASSINARI, MACY, SPANO e RYU (1980), a operação de moagem possibilita o uso de uma lama com 30% de jornal no reator de hidrólise, enquanto que é muito difícil preparar suspensões com 10% de jornal *pré-tratado de qualquer outro modo*. No entanto, é necessário ressaltar que a eficácia da utilização do substrato pelo sistema enzimático, medida por rendimento em açúcares, diminui com o aumento da concentração do mesmo.

Um grande passo para a efetivação de tratamentos mecânicos de resíduos lignocelulósicos foi dado quando TASSINARI & MACY (1977) adaptaram o moinho de dois rolos, tradicionalmente usado na indústria de plásticos e

borracha (misturador de polímeros visco-elásticos). O tempo habitualmente requerido para a produção de substratos com altos níveis de conversão, foi reduzido de cerca de 24 horas (moinho de bolas) para alguns minutos (moinho de dois rolos).

O tratamento em moinho de dois rolos reduz a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose. Segundo TASSINARI & MACY (1977) o processo é exotêmico, mas o efeito do calor gerado durante a moagem sobre a celulose não foi avaliado.

Foi visto que o aquecimento (250°C, 40 min) anterior à moagem, produz um substrato significativamente mais suscetível à hidrólise do que apenas moagem. Esses resultados estão de acordo com aqueles de KATZ & REESE (1968) e GHOSE & KOSTICK (1969). Os últimos autores associaram o aumento da qualidade do substrato pré-aquecido à presença de uma quantidade mais elevada de finos (partículas menores de 53 μ) no produto. É importante ressaltar que as causas pelas quais a associação entre aquecimento e moagem produzem um grande incremento na velocidade e extensão da hidrólise são ainda desconhecidas. Alguns fatos sugerem que o sinergismo observado possa ser explicado a nível molecular: a quebra da cadeia por ação térmica e mecânica ocorre através de reações do tipo radicalar; a ligação clivada em ambos os processos é, preferencialmente, a β -1-4 glicosídica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ARTHUR Jr., J.C. & HINOJOSA, O. - Thermal initiation of free radicals in cotton cellulose. Text Res. J., Princeton, 385-7, Apr., 1966
- ASSAF, A.G.; HAAS, R.H.; PURVES, C.B. - A study of the amorphous portions of dry, swollen cellulose by an improved thallous ethylate method. J.Am.Chem.Soc., Washington, 66: 59-65, Jan., 1944
- ASSARSSON, A.; LINDBERG, B.; THEANDER, O. - Studies on mechanically degraded cellulose. Acta. Chem.Scand., Copenhagen, 13(6):1231-4. 1959
- BHATTACHARJEE, S.S. & PERLIN, A.S. - Enzymatic degradation of carboxymethylcellulose and other cellulose derivatives. J.Polym.Sci., Part C, New York, (36):509-21, 1971
- BUTYAGIN, P.Yu. - Active intermediate states in the mechanical degradation of polymers. Doklady Akad.Nauk.S.S.S.R. 140:145-8, 1961. Apud: Chem.Abstrs., Columbus, 56:10367 b,

*De acordo com as normas preconizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index, Columbus, 1975.

1962.

BUTYAGIN, P.Yu.- Mechanochemical transformations in macromolecules at 80⁰K. Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R., Moscow, 148(1):129-31, Jan., 1963

BUTYAGIN, P.Yu.; BERLIN, A.A.; KALMANSON, A.E.; BLYUMENFEL'd, L.A. - Formation of macroradicals in the mechanical destruction of vitrified polymers. Vysokomolekul. Soedin. 1: 865-8, 1959. Apud: Chem. Abstrs., Columbus, 54:13719 d, 1960.

CASALE, A. & PORTER, R.S. - Natural polymers. In _____. Polymer stress reactions. New York, Academic Press, 1979. v.2, p.296-307.

CASTANON, M & WILKE, C.R. - Effects of the surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. Biotechnol. Bioeng., New York, 23:1365-72, 1982.

CAULFIELD, D.F. & MOORE, W.E. - Effect of varying crystallinity of cellulose on enzymic hydrolysis. Wood Sci., Madison, 6 (4):375-9, Apr. 1974

CAULFIELD, F.D. & STEFFES, R.A. - Water-induced recrystallization of cellulose. TAPPI, New York, 52 (7):1361-6, Jul. 1969

- CERESA, R.J. - Mechanico-chemical synthesis. In: _____. Block and graft copolymers. London, Butterworth, 1962. p.65-101
- CHAUDHURI, N.K.; ARAVINDANATH, S.; BETRABET, S.M. - Direct evidence of crystalline aggregation of dyes in cellulose fibers by electron diffraction. J.Polym.Sci., Polym.Lett. Ed., New York, 19:131-5, 1981
- CLARK, J.d'A. - Effect of substituents on hygroscopicity. In: _____. Pulp technology and treatment for paper. San Francisco, Miller Freeman, 1978. p. 117
- CONRAD, C.M.; TRIPP, V.W.; MARES, T. - Thermal degradation in tire cords. Part I: Effects on strength, elongation, and degree of polymerization. Text.Res.J., Princeton, 726-39, Oct. 1951.
- COWLING, E.B. & KIRK, T.K. - Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnol.Bioeng.Symp., New York, (6):95-123, 1979
- ELLEFSSEN, Ø. & TØNNESEN, B.A. - Polymorphic forms. In: BIKALES, W.M. & SEGAL, L., eds. - Cellulose and cellulose derivatives. New York, Wiley - Interscience, 1971. p. 151-80. (High polymers, 5)

ENDE, H.A. & STANNET, V. - Density gradient centrifugation of a graft copolymer. J.Polim.Sci. Part A, New York, 2: 4047-51, 1964

ERMOLENKO, N.; SVIRIDOVA, R.N.; POTAPOVICH, A.K. - Effect of oxygen on the electron paramagnetic ressonance in the pyrolysis products of some cellulose derivatives. Vesti Akad.Navuk Belanus. SSR, Ser.Khim.Navak., (3),111-12, 1966. Apud: Chem.Abstrs., Columbus, 66:24303 g, 1967

FAN, L.T.; LEE, Y.H., BEARDMORE, D.H. - Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. Bio technol. Bioeng., New York, 22:177-99, 1980

FORZIATI, F.H.; STONE, W.K.; ROWEN, J.W.; APPEL, W.D. - Cotton powder for infrared transmission measurements. J.Res. Nat.Bur.Stand., Washington, 45(2):109-13, Aug. 1950

GHOSE, T.K. & GHOSH, P. - Bioconversion of cellulosic substances. J.Appl.Chem.Biotechnol., London, 28:309-20, 1968

GHOSE, T.K. & KOSTICK, J.A. - Enzymatic saccharification of cellulose in semi-and continuously agitated systems. Adv. Chem.Ser., Washington, 95:415-46, 1969

GROHN, H. - Über den Mechanochemischen Abbau von Zellstof

durch Schwingmahlung. J.Polym.Sci., New York, 30:551-9, 1958

HASEGAWA, H. & TSUCHIDA, H. - Abstrs.Debates ESR, 16th, Sendai, 1977, p.122-123. Apud: KUDO, T. & HEUSINGER, H. - Formation of mechanoradicals in D-glucose and lactose. Carbohydr.Res., Amsterdam, 103:7-14, 1982

HESS, K.; KIESSIG, H.; GUNDERMANN, J. - Röntgenographische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Vorgänge beim Vermahlen von Cellulose. Z.Phys.Chem., Leipzig, 49B: 64-82, 1941

HESS, K.; STEURER, E.; FROMM, H. - Über den Einfluß des Mahlvorganges auf die Eigenschaften von Hochpolymeren (Zellulose und Polystyrol) und über das Wesen seiner Wirkung. I. Teil. Kolloid-Z., Darmstadt, 98(2):148-59, Nov. 1942

HON, D.N.S. - Photooxidative degradation of cellulose: reactions of the cellulosic free radicals with oxygen. J.Polym.Sci., New York, 17:441-45, 1979

HOWSMON, J.A. & MARCHESSAULT, R.H. - The ball-milling of cellulose fibers and recrystallization effects. J.Appl.Polym.Sci., New York, 1(3):313-22, 1959

HOWSMON, J.A. & SISSON, W.A. - Structure and properties of cellulose fibers. B. Submicroscopic structure. In: OTT, E.; SPURLIN, H.M.; GRAFFLIN, M.W., eds. Cellulose and cellulose derivatives. 2 ed. New York, Interscience, 1954 p.231-316, (High polymers, 5)

JURASEK, L. & BROWN Jr., R.D. - Preface. In: BROWN Jr., R.P. & JURASEK, L., eds. Hydrolysis of cellulose; mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Washington, American Chemical Society, 1979, p.ix-x (Advances in Chemistry Series, 181).

KARGIN, V.A. & PLATE, N.A. - Chemical grafting on crystal surfaces. Vysokomolek.Soedin., Vsesoyuz.Khim.Obshchestvo im D.I.Mendeleeva 1. (2):330-1, 1959. Apud: Chem.Abstrs. Columbus, 53:19437 c, 1959

KARGIN, V.A. & PLATE, N.A. - Polymerization and grafting processes on freshly formed surfaces. J.Polym.Sci., New York, 52: 155-8, 1961

KATZ, M. & REESE, E.T. - Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. Appl.Microbiol., Baltimore, 16 (2):419-20, Feb. 1968

KAUSCH, H.H., Polymer Fractures, Springer, Berlin, 1978.
Apud: KUDO, T. & HEUSINGER, H. - Formation of mechano-ra

dicals in D-glucose and lactose. Carbohydr.Res., Amsterdam, 103:7-14, 1982

KILZER, F.J. - Thermal degradation. In: BIKALES, N.M. & SEGAL, L. eds. - Cellulose and cellulose derivatives. New York, Wiley - Interscience, 1971. p.1015-46. (High polymers, 5)

KLEINERT, T.N. & MORTON, J.R. - Electron spin resonance in wood-grinding and wood-pulping. Nature, London, 196:334-6, Oct. 1962

KLOP, W. & KOOIMAN, P. - The action of cellulolytic enzymes on substituted cellulose. Biochem. Biophys. Acta, Amsterdam, 99:102-20, 1965

KUDO, T. & HEUSINGER, H. - Formation of mechano-radicals in D-glucose and lactose. Carbohydr.Res., Amsterdam, 103:7-14, 1982

KULP, K. - Cellulases. In: REED, G. Enzymes in food processing, 2 ed., New York, Academic Press, 1975, p.175-82

KULSHRESHTHA, A.K.; PATEL, A.R.; BADDI, N.T.; SRIVASTAVA, H. C. - Studies on never-dried cotton. J.Polym.Sci., Polym. Chem.Ed., New York, 15:165-83, 1977

LADISCH, M.R.; LADISCH, C.M.; TSAO, G.T. - Cellulose to sugars: new path gives quantitative yield. Science, Washington, 201:743-5, Aug. 1978

LEOPOLD, B. & FUJII, J.S. - Degradation by mechanical action as a means of studying cellulose-water interaction. J.Polym.Sci., Part C, New York, (11):449-60, 1965

LEOPOLD, B. & MOULIK, S.K.R. - Mechanical degradation of chemical wood pulps. TAPPI, New York, 51(8) 334-9, Aug. 1968

LIANG, C.Y. & MARCHESSAULT, R.H. - Infrared spectra of crystalline polysaccharides. I. Hydrogen bonds in native celluloses. J.Polym. Sci., New York, 37: 385-95, 1959

LILLEVIK, H.A. - The determination of total organic nitrogen. In: JOSLYN, M. - Methods in food analysis. Physical, chemical and instrumental methods of analysis. 2 ed., New York, Academic Press, 1970, p.605-9 (Food science and technology)

LIN, I.J. & SOMASUNDARAN, P. Powder Technol., 6, 171, 1972.
Apud: SOMASUNDARAN, P. & MOUDGIL, B.M. - Preparation and characterization of clean mineral surfaces. In: MITTAL, K.L., ed. Surface contamination, New York, Plenum, 1979, v.1, p.457-75

LIPINSKY, E. - Perspectives on preparation of cellulose for hydrolysis. In: BROWN Jr., R.D. & JURASEK, L., eds. Hydrolysis of cellulose; mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Washington, American Chemical Society, 1979, p. 1-23 (Advances in chemistry series, 181)

MANDELS, M.; HONTZ, L.; NYSTROM, J. - Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol.Bioeng., New York, 16: 1471-93, 1974

MANDELS, M. & REESE, E.T. - Dev.Ind.Microbiol., 5:5, 1964.
Apud: WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. - Synergism between enzymes involved in solubilization of native cellulose. In: BROWN Jr., R.D. & JURASEK, L., eds. Hydrolysis of cellulose; mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Washington, American Chemical Society, 1979, p.181-209, (Advances in chemistry series, 181)

MARCHESSAULT, R.H. - Relationship between fine structure and enzymic degradation of cellulose. In: Abstracts of papers, cellulose, paper and textile div. Am.Chem.Soc., Appleton, W.I., May 1978. Apud: LIPINSKY, E. - Perspectives on preparation of cellulose for hydrolysis. In: BROWN Jr., R.D. & JURASEK, L. eds. Hydrolysis of cellulose; mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Washington, American Chemical Society, 1979, p.1-23 (Advances in chemistry series, 181)

MARCHESSAULT, R.H. & St-PIERRE, J. - A new understanding of the carbohydrate system, Proc. of World Conference on Future Sources of Organic Raw Materials, Toronto, July, 1978, in press. Apud: LIPINSKY, E. - Perspectives on preparation of cellulose for hydrolysis. In: BROWN Jr., R.D & JURASEK, L., eds. Hydrolysis of cellulose; mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Washington, American Chemical Society, 1979, p.1-23. (Advances in chemistry series, 181)

MARK, H. - Structures and properties of cellulose fibers. A. Interaction and arrangement of cellulose chains. In: OTT, E.; SPURLIN, H.M.; GRAFFLIN, M.W., eds. Cellulose and cellulose derivatives. 2 ed. New York, Interscience, 1954, p. 217-30. (High polymers, 5)

McBURNEY, L.F. - Degradation of cellulose. 1. Kinetics of degradation. In: OTT, E.; SPURLIN, H.M.; GRAFFLIN, M.W., eds. Cellulose and cellulose derivatives. 2 ed. New York Interscience, 1954. p. 99-195 (High polymers, 5)

MERCHANT, M.V. - A study of water-swollen cellulose fibers which have been liquid-exchanged and dried from hydrocarbons. TAPPI, New York, 40(9):771-81, Sept. 1957

MEYER, K.H. & MISCH, L. - Positions des atomes dans le nouveau modèle spatial de la cellulose. Helv.Chem.Acta., Ba

sel, 20: 232-44, 1937

OTT, R.L. - Mechanism of the mechanical degradation of cellulose. J.Polym.Sci., Part A, New York, 2:973-82, 1964

PHILIPP, B. & SCHLEICHER, H. - Variation of performance properties of cellulose by chemical transformation. Pure Appl. Chem., London, 51:2363-72, 1979

PLATE, N.A.; PROKOPENKO, U.V.; KARGIN, V.A. - Polymerization of certain monomers during dispersion of inorganic substances - Vysokomolekul -Soedin. 1:1713-20, 1959. Apud: Chem.Abstrs., Columbus, 54:19008 f, 1960.

RANBY, B.G. - The mercerization of cellulose I. A thermodynamic discussion. Acta. Chem. Scand., Copenhagen, 6:101-15, 1952

REESE, E.T., In: Natural Organic Macromolecules, New York, Pergamon, 1962. p. 130. Apud: ZABRISKIE, D.W., QUTUBUDDIN, S.A.S.M.; DOWING, K.M. - Production of ethanol from cellulose using a soluble cellulose, derivatives as an intermediate. Biotechnol. Bioeng.Symp., New York, (10); 149-62, 1980.

RYU, D.D.Y.; LEE, S.B.; TASSINARI, T.; MACY, C. - Effect of compression milling on cellulose structure and on enzyma

tic hydrolysis kinetics. Biotechnol. Bioeng., New York, 24:1047-67, 1982

SADDLER, J.N.; BROWNELL, H.H.; CLERMONT, L.P.; LEVITIN, N.-
Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated
wood fractions. Biotechnol. Bioeng., New York, 24:1389-
-402, 1982

SEGAL, L. - Effect on morphology on reactivity. In: BIKALES,
N.M. & SEGAL, L., eds. - Cellulose and cellulose deriva-
tives. New York, Wiley-Interscience, 1971. p. 719-40,
(High Polymers, 5)

SIMIONESCU, C. & VASILIU-OPREA, C. - Das Verhalten von
Zellstoffen beim Mechanochemischen Abbau durch Schwing-
mahlung. Cellul. Chem.Technol., Iasi, 2:155-84, 1968

SIMIONESCU, C. & VASILIU-OPREA, C. - Kinetik des mechanoche-
mischen Abbaus der Cellulose durch Schwingmahlung. Cellul.
Chem.Technol., Iasi, 3:361-81, 1969

SIMIONESCU, C.; VASILIU-OPREA, C.; NEGULIANU, C. - Mechano-
chemical syntheses. J.Polym.Sci., Polym.Symp., New York,
64:149-80, 1978

SKINNER, K.J. - Enzymes technology. Chem. Eng. News, Washing-
ton, 53(33):22-41, 1975

SOMASUNDARAN, P. & MOUDGIL, B.M. - Preparation and characterization of clean mineral surfaces. In: MITTAL, K.L., ed. Surface contamination. New York, Plenum, 1979. v. 1, p. 457-75.

STAMM, A.J., Surface properties of cellulosic materials. In: Wood chemistry, 2 ed. New York, Reinhold, 1952, v. 2, p. 762. Apud: MERCHANT, M.V. - A study of water swollen cellulose fibers which have been liquid-exchanged and dried from hydrocarbons. TAPPI, New York, 40(9):771-81, Sept. 1957

STANNETT, V.T. & HOPFENBERG, H.B. - Graft copolymers. In: BIKALES, N.M. & SEGAL, L., eds. - Cellulose and cellulose derivatives. New York, Wiley - Interscience, 1971. p. 907 - 36. (High polymers, 5)

STEURER, E. & HESS, K. - Über die Vorgänge bei der Verformung und dem mechanochemischen Abbau hochpolymer Stoffe durch Schwingmahlung. Z.Phys-Chem., Leipzig, 193:248-57, 1944

TASSINARI, T. & MACY, C. - Differential speed tow roll mill pretreatment of cellulosic materials for enzymatic hydrolysis. Biotechnol. Bioeng., New York, 19:1321-30, 1977

TASSINARI, T.; MACY, C.; SPANO, L.; RYU, D.D.Y. - Energy requirements and process design considerations in compres-

sion-milling pretreatment of cellulosic wastes for enzymatic hydrolysis. Biotechnol.Bioeng. New York, 22:1689-705, 1980

TØNNESEN, B.A. & ELLEFSEN, Ø. - Submicroscopical investigations. In: BIKALES, N.M. & SEGAL, L., eds. - Cellulose and cellulose derivatives. New York, Wiley - Interscience, 1971. p. 265-303 (High polymers, 5)

TROTMAN, E.R. - The direct dyes. In: _____. Dyeing and chemical technology of textile fibers. 4 ed., London, Charles Griffin, 1970, p.405-30

URBAŃSKI, T. - Formation of solid free radicals by mechanical action. Nature, London, 216(11):577-8, Nov. 1967

WADEHRA, I.L. & MANLEY, R. St. J. - Recrystallization of amorphous cellulose. J.Appl.Polymer Sci., New York, 9: 2677-30, 1965

WARWICKER, J.O. - Swelling. In: BIKALES, N.M. & SEGAL, L., eds. - Cellulose and cellulose derivatives. New York, Wiley - Interscience, 1971. p. 325-79 (High polymers, 5)

WIJNMAN, C.F. - Influence of heavy beating of cotton fibers on molecule length and crystallinity. TAPPI, New York, 37, (3):96-8, Mar. 1954

WIRICK, M.G. - J.Polym.Sci. Part A. - 6:1965-1968. Apud:

BHATTACHARJEE, S.S. & PERLIN, A.S. - Enzymatic degradation of carboxymethylcellulose and other cellulose derivatives. J.Polym.Sci., Part C, (36):509-21, 1971

WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. - Synergism between enzymes involved in solubilization of native cellulose. In: BROWN Jr., R.D. & JURASEK, L., eds. Hydrolysis of cellulose; mechanisms of enzymatic and acid catalysis. Washington, American Chemical Society, 1979, p. 181-209 (Advances in chemistry series, 181)

ZABRISKIE, D.W.; QUTUBUDDIN, S.A.S.M.; DOWNING, K.M. - Production of ethanol from cellulose using a soluble cellulose derivative as an intermediate. Biotechnol. Bioeng. Symp., New York, (10): 149-62, 1980