

ESTUDO DO HIDROLISADO DE EUCALIPTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES UTILIZANDO EVAPORAÇÃO A VÁCUO PARA FINS FERMENTATIVOS

Resumo

Cavacos de eucalipto da espécie *Eucalyptus grandis* foram submetidos à hidrólise ácida resultando em um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis. A partir deste hidrolisado estudou-se a concentração do mesmo utilizando evaporador a vácuo, bem como o efeito desta concentração, nas características do hidrolisado. Constatou-se que o teor de xilose (principal açúcar) aumentou proporcionalmente com os fatores de concentração de 2,5 e 4,5 vezes.

Palavras-chave: eucalipto, hidrolisado, diferentes concentrações, biotecnologia

Summary

Eucalyptus wood chips from the species of *Eucalyptus grandis* were submitted to acid hydrolysis obtaining a rich hydrolysate in sugar yeast. From this hydrolysis, it was studied the concentration of the same by using vacuum evaporator as well as the hydrolysate effect of this concentration in the characteristics of hydrolysis. It was verified that the content of xyloses (mainly sugar) increased proportionally with the concentration factors of 2,5 and 4,5 times.

Keywords: eucalyptus, hydrolysate, different concentrations, biotechnology

Introdução

A biomassa lignocelulósica é composta basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de extrativos e sais minerais (1,2).

A celulose, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polímero linear de D-glicose cujas unidades estão unidas por ligações β (1-4) com uma estrutura cristalina altamente ordenada e de alta massa molecular (1,2).

A lignina é composta de um conjunto de polímeros amorfos reticulares de alta massa molecular, geralmente associado com a celulose e a hemicelulose, com estrutura química fortemente aromática, composta por anéis de benzeno que contêm grupos fenólicos livres e metilados (1-3).

As hemiceluloses são polímeros ramificados compostos de polissacarídeos de baixa massa molecular, associados à parede celular das plantas com a celulose e a lignina (4). São heteroglicanos constituídos por relativamente poucos resíduos de açúcar, sendo os mais comuns a D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose e L-arabinose, que conferem características aos diferentes tipos de hemicelulose como arabinogalactana, galactoglicomanana, glicomanana e arabinoxilana (4). O principal componente da fração hemicelulósica dos resíduos agro-industriais é a xilana, polímero constituído por unidades de xilose que pode ser hidrolisada usando ácidos minerais (1,2,5). A xilana possui uma estrutura linear constituída de xilopiranosil unidos por ligações β (1-4) que são encontradas em todas as plantas terrestres e compreendem a 30% do material da parede celular.

O aproveitamento dos resíduos florestais e agro-industriais como substratos em processos biotecnológicos para a produção de produtos de alto valor agregado é uma alternativa atrativa e promissora, uma vez que estes materiais são abundantes, renováveis e de baixo custo. A bioconversão destes materiais poliméricos requer um processo que compreende duas etapas: hidrólise, ácida ou enzimática, dos polímeros de açúcares em monossacarídeos, seguido de bioconversão dos monômeros em um produto de interesse industrial (6).

Visando o aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico de cavacos de eucalipto no processo de bioconversão de xilose a xilitol, o presente trabalho vem demonstrar os efeitos da evaporação a vácuo, nas concentrações dos diferentes compostos presentes neste hidrolisado, sobretudo a xilose, para que futuros estudos demonstrem a influência da concentração inicial deste açúcar no processo biotecnológico de obtenção de xilitol.

Material e Métodos

Hidrólise ácida dos cavacos de eucalipto

Os cavacos de eucalipto foram hidrolisados em um reator de aço de 22dm³ de capacidade útil. A hidrólise foi realizada conforme metodologia estabelecida por Almeida e Silva *et.al.* (7) de acordo com as seguintes condições: relação água para massa seca de

Giovani Brandão Mafra de Carvalho,^{1*} Yovanka P Ginoris,¹ Elisângela de J Cândido,¹ Larissa Canilha,¹ Walter Carvalho,¹ João B Almeida e Silva¹

¹Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia

* Autor para correspondência:
Faculdade de Engenharia Química de Lorena
Departamento de Biotecnologia
Rodovia Itajubá-Lorena, Km 74,5
CEP: 12600-000. Lorena. SP
E-mail:
gbmafra@yahoo.com.br

madeira igual 1 para 4,5; temperatura de 156°C; tempo de reação de 0,45h e concentração de 0,35% de ácido sulfúrico.

Concentração

A fim de aumentar o teor de xilose para valores 2,5 e 4,5 vezes maiores que o inicial, o hidrolisado foi concentrado em evaporador rotatório a vácuo de 4dm³ de capacidade útil, operando a 70°C ± 5°C. O hidrolisado concentrado foi caracterizado quanto a pH, concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos derivados da degradação da lignina.

Determinação do pH

Os valores de pH dos hidrolisados foram determinados em pHmetro Micronal modelo 374.

Determinação das concentrações de açúcares e ácido acético

As concentrações de açúcares e ácido acético foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu-LC-10AD, empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 45°C, fluxo de eluente igual a 36cm³.h⁻¹, volume da amostra injetada 20µdm³. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sepack C18 (Millipore) e o eluente antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana HAWP 0,45µm (Millipore) e em seguida foi degaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 0,25 h.

Determinação das concentrações de furfural e 5- hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural nos hidrolisados foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu-LC-10AD, sob as seguintes condições: coluna Hewlett-Packard RP 18 (200mm); temperatura da coluna: 25°C, detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS; eluente: solução de acetronitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume de amostra injetada 20µdm³. As amostras foram diluídas e filtradas a vácuo em membrana HAWP 0,45µm (Millipore). O eluente foi filtrado a vácuo em membrana GVWP 0,22µm (Millipore) e, em seguida, degaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 0,25h.

Determinação do teor de produtos de decomposição da lignina

O teor dos produtos derivados da decomposição da lignina foi analisado através da quantificação da lignina Klason solúvel em meio ácido, de acordo com metodologia proposta por Rocha (8).

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de NaOH 6M e diluída com água destilada de forma a se

obter uma leitura inferior a uma unidade de absorvância. A absorvância desta solução foi determinada num comprimento de onda de 280nm utilizando água destilada como referência. A concentração de lignina foi calculada por meio da Equação abaixo, levando-se em consideração a normalização das concentrações em função do fator de diluição utilizado.

$$C_{LIG} = 4.187 \times 10^{-2} (A_{LIG} - A_{PD280}) - 3.279 \times 10^{-4}$$

Onde:

C_{LIG} = Concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido (g.dm⁻³)

A_{LIG280} = absorvância da solução em 280nm

$A_{PD280} = C_1 \times \epsilon_1 + C_2 \times \epsilon_2$; Onde C_1, C_2 = Concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural determinadas por HPLC; ϵ_1, ϵ_2 = coeficientes de extinção do furfural (146.85dm³g⁻¹cm⁻¹) e do 5-hidroximetilfurfural (114.00dm³g⁻¹cm⁻¹), determinados por espectroscopia UV em 280nm.

Resultados e Discussão

No presente trabalho foi obtido o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto conforme metodologia descrita por Almeida e Silva *et al.* (7). O hidrolisado ácido foi concentrado a vácuo 2,5 e 4,5 vezes sua concentração inicial. As características do hidrolisado original, obtido da fração hemicelulósica de eucalipto, bem como dos hidrolisados concentrados pelos fatores 2,5 e 4,5 estão apresentados na Tabela 1.

Observa-se na Tabela 1 que a xilose (24,32g.dm⁻³) é o açúcar predominante no hidrolisado. A glicose (1,53g.dm⁻³) e a arabinose (0,53g.dm⁻³), estão presentes em baixas concentrações conforme já constatado nos hidrolisados hemicelulósicos de eucalipto (Almeida e Silva *et al.* (7), Parajó *et al.* (9), Canettieri *et al.* (10), Carvalho *et al.* (11), de bagaço de cana-de-açúcar [Felipe *et al.* (12), Alves (13) e de palha de arroz Roberto *et al.* (14)].

Tem sido constatado que a predominância de xilose em relação a outros açúcares comumente encontrados nos hidrolisados hemicelulósicos, em particular a glicose, é uma característica indesejável para a bioconversão de xilose a xilitol, uma vez que a presença de glicose inibe o metabolismo de xilose pelas leveduras [Lee *et al.* (15), Preziosi-Belloy (16), Girio *et al.* (17)], sendo esta inibição dependente da concentração dessa hexose no meio de fermentação [Sugai and Delgenes (18), Felipe (19)].

Pela análise da Tabela 1 verifica-se que, além dos açúcares, o hidrolisado apresenta um grupo de compostos que têm sido apontados como inibidores potenciais de metabolismo de leveduras. Os compostos tóxicos caracterizados neste trabalho foram o furfural, o hidroximetilfurfural, o ácido acético, assim como os compostos aromáticos de baixa massa molar oriundos da degradação da lignina e dos extrativos da madeira.

Os teores de ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural encontrados no hidrolisado (Tabela 1) são similares aos valores obtidos por Almeida e Silva *et al.* (7) ao submeter cavacos de eucalipto da mesma espécie a condições hidrolíticas semelhantes às utilizadas neste estudo.

Tem sido observado que a concentração desses compostos

Tabela 1. Composição parcial, em g.dm⁻³, do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto obtido por hidrólise ácida, em sua forma original e após ser submetido ao processo de concentração.

		Hidrolisado		
		Original	FC = 2,5	FC = 4,5
pH		1,80	1,50	1,20
Açúcares	Xilose (g.dm ⁻³)	24,32	64,20	108,40
	Glicose (g.dm ⁻³)	1,53	4,03	6,84
	Arabinose (g.dm ⁻³)	0,53	1,39	2,36
Inibidores	Ácido Acético (g.dm ⁻³)	5,90	8,51	9,31
	Furfural (g.dm ⁻³)	0,54	0,05	0,02
	HMF* (g.dm ⁻³)	0,10	0,24	0,41
	CDL** (g.dm ⁻³)	1,41	2,75	4,78

* 5 – Hidroximetilfurfural.

** Compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em ácido e dos extrativos da madeira.

nos hidrolisados hemicelulósicos varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidrolíticas empregadas para a extração da fração hemicelulósica [Frazer and MacCaskey (20), Silva *et al.* (21), Larson *et al.* (22)]. Desta forma, tem sido relatada a presença de ácido acético nos hidrolisados de diferentes tipos de madeiras em concentrações na ordem de 12,0g.dm⁻³ [Tran and Chambers (23)] e 10,0g.dm⁻³ [Ferrari *et al.* (24)] para os hidrolisados de carvalho vermelho até 24,3g.dm⁻³ no hidrolisado de eucalipto [Felipe *et al.* (25)].

Nota-se ainda na Tabela 1 que o hidrolisado obtido contém um grupo de compostos aromáticos de baixa massa molar. Conforme relatado por Clark and Mackie (26), a hidrólise da fração hemicelulósica da madeira promove a solubilização simultânea da lignina, o que resulta na formação destes compostos. Segundo esses autores, as madeiras duras como o eucalipto, caracterizam-se por apresentar uma lignina de baixa massa molar, pouco reativa, o que impede a ocorrência de reações de condensação dos fragmentos de lignina solúveis em meios ácidos, favorecendo-se deste modo, a solubilização de compostos monoméricos. O teor desses compostos encontrado no hidrolisado foi similar ao valor encontrado por Canettieri (10) (1,25g.dm⁻³) no hidrolisado de eucalipto obtido pelo mesmo procedimento de hidrólise empregado no presente trabalho.

Verifica-se também na Tabela 1 que as condições de hidrólise utilizadas provocaram a degradação parcial das pentoses e hexoses, gerando furfural e 5-hidroximetilfurfural em baixas concentrações. O teor de furfural obtido nas condições do presente estudo é similar ao valor obtido por Parajó *et al.* (9), não sendo detectada a presença de 5-hidroximetilfurfural por esses autores no hidrolisado de *Eucalyptus globulus*.

Podemos constatar (Tabela 1) que, ao se concentrar o hidrolisado, ocorreu um aumento proporcional da concentração dos açúcares em função do fator de concentração (razão de volume inicial pelo volume final de hidrolisado), mantendo-se constante a relação xilose/glicose (15.9) tanto no hidrolisado

original quanto nos hidrolisados concentrados. Tem sido constatado um aumento dessa relação durante o processo de concentração a vácuo o qual, segundo Fenguel and Wegener (27), deve-se à degradação parcial da xilose a furfural durante este processo, o que no presente trabalho não ocorreu.

Semelhante aos açúcares, o 5-hidroximetilfurfural teve sua concentração aumentada proporcionalmente aos fatores de concentração. Acosta (28), constatou um comportamento similar ao concentrar hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar três vezes de seu volume inicial.

Quanto ao ácido acético, verifica-se na Tabela 1 um aumento de concentração deste composto, porém de forma não proporcional aos fatores de concentração utilizados. Conforme estudos realizados por Rodrigues (29) o baixo pH do hidrolisado (aproximadamente 1,0) favorece a parcial volatilização deste ácido que, nestas condições encontra-se sob a forma não dissociada. O aumento não proporcional na concentração do ácido também foi observado por Parajó *et al.* (30) durante a concentração de hidrolisado hemicelulósico de *Eucalyptus globulus*.

Nota-se na Tabela 1 que o processo de concentração a vácuo causou uma redução substancial da concentração furfural em 90% e 96% nos hidrolisado concentrados 2,5 e 4,5 vezes respectivamente, em relação a sua concentração no hidrolisado original. Esse comportamento pode ser atribuído às características físico-químicas deste composto que, em condições de pressão reduzida apresenta ponto de ebulição de 54-55°C [Perry (31)] o que possibilita a sua remoção quase total nas condições de temperatura ($\pm 70^\circ\text{C}$) e pressão utilizadas neste trabalho. Uma redução considerável do teor deste composto foi também observada por Canettieri (10) após concentrar o hidrolisado de eucalipto a três e quatro vezes de sua concentração inicial de xilose.

Os compostos aromáticos de baixa massa molar (Tabela 1), não aumentaram sua concentração proporcional aos fatores de concentração avaliados. O aumento foi de 72% para o hidrolisado concentrado 2,5 vezes e de 22% para o hidrolisado concentrado 4,5 vezes. Este comportamento pode ser explicado se levarmos em consideração que, além dos compostos oriundos da degradação da lignina, o hidrolisado original contém uma variedade de compostos aromáticos derivados da degradação dos extrativos da madeira, sendo que alguns deles são voláteis e hidrossolúveis [Perry (31)], pelo que nas condições operacionais do processo de concentração a vácuo podem ser arrastados pelo vapor de água.

Verifica-se ainda na Tabela 1 que o processo de concentração a vácuo provocou um decréscimo do pH original de 1,8 para 1,5 no hidrolisado concentrado no nível mínimo de fator de concentração (FC= 2,5) e para 1,2 no hidrolisado concentrado no nível máximo do fator de concentração (FC= 4,5). Essa redução provavelmente está relacionada com o aumento da concentração de íons H⁺ provenientes do H₂SO₄ utilizado na hidrólise ácida dos cavacos de eucalipto [Côrrea *et al.* (31)] e também de ácido acético presente no hidrolisado.

Os resultados deste trabalho demonstram o grande potencial do hidrolisado hemicelulósico de cavacos de eucalipto como fonte de carboidratos para processos biotecnológicos, quando devidamente concentrado utilizando evaporação a vácuo. O grande

desafio é a redução do teor de inibidores a baixos índices. Futuros estudos deverão empregar técnicas físicas e químicas para reduzir os valores de concentração destes compostos a níveis não inibitórios sem que haja perda substancial de xilose neste hidrolisado.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP e da CAPES (Brasil).

Referências

1. Khuad RC, Singh A. *Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects*. **Critical Reviews in Biotechnology** 13: 151-172, 1993.
2. Singh A, Mishra P. *Microbialpentose utilization. Current applications in Biotechnology*. **Progress in Industrial Microbiology**. Elsevier Science 33, 1995.
3. Ferraz A. *Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose*. **Biotecnologia Industrial**, Editora Edgard Blücher LTDA—Cap 21, 3: 466-467, 2001.
4. Puls J, Schuseil J. In: Coughlan, M. P & Hazlewood, G. P. **Hemicellulose and Hemicellulases**. Portland Press, Cambridge, 1-27, 1993.
5. Cowling EB. *Physical and chemical constrains in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materiais*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium** 5:163-181, 1975.
6. Lohmeier-Voger EM, Sopher CR. & Lee H. *Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 20: 75-81, 1998.
7. Almeida e Silva JB, Canilha, Larissa, Canettieri EV, Felipe MGA. & Solenzal, AIN. *Use of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the bioconversion of xylose into xylitol in eucalyptus hemicellulosic hydrolysate*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 78: 945-948, 2003.
8. Rocha GJM. *Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio*. São Carlos: IQSC/USP, Tese de Doutorado, 136, 2000.
9. Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM. *Charcoal Adsorption of Wood Hydrolysate for Improving their Fermentability: Influence of the Operational Conditions*. **Bioresource Technology** 57: 179-185, 1996.
10. Canettieri EV, Almeida e Silva JB, Felipe MGA. *Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 38: 323 – 331, 2002.
11. Carvalho GBM, Cândido EJ, Carvalho W, Dragone G, Almeida e Silva JB. *Chemical characterization of coffee rind: a plentiful residue that can be used in biotechnological processes*. In: 26th Symposium on biotechnology for fuels and chemicals, Chattanooga, Tennessee, 57 May 9-12, 2004.
12. Felipe MGA. *et al.* *Preparação de Xilitol por Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia** 36: 103-114, 1993.
13. Alves LA. *Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar para a Produção Biotecnológica de Xilitol*. São Paulo, FAENQUIL/Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Dissertação de Mestrado, 100, 1997.
14. Roberto IC, Mancilha IM, Souza CMA, Felipe MGA, Sato S, Castro HF. *Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters** 16: 1211-1216, 1994.
15. Lee YY, McCaskey TA. *Hemicellulosic Hydrolysis and Fermentation of Resulting Pentoses to Ethanol*. **Tappi Journal** 66: 102-107, 1983.
16. Preziosi - Belloy L, Nolleau V, Navarro JM. *Fermentation of hemicellulosic sugars and sugars mixtures to xylitol by Candida parapsilosis*. **Enzyme Microbial and Technology** 21: 124-129, 1997.
17. Gírio FM, Amaro C, Azinheiral H, Pelica F, Amaral-Collaço MT. *Polyols production during single and mixed substrate fermentations in Debaromyces hansenii*. **Bioresource Technology** 71: 245-251, 2000.
18. Sugai JK, Delgenes JP. *Catabolite repression of induction of aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in Candida guilliermondii*. **Current Microbiology** 31: 239-244, 1995.
19. Felipe MGA, Vieira DC, Vitolo M, Silva SS, Roberto IC, Mancilha IM. *Effect of acetic acid on xylose fermentation to xilitol by Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin 35: 171-177, 1995.
20. Frazer FR, McCaskey TA. *Wood Hydrolysate Treatments for Improved Fermentation of Wood Sugars to 2,3-Butanediol*. **Biomass** 18: 31-42, 1989.
21. Silva SS, Felipe MGA, Almeida e Silva JB, Prata AMR. *Acid hydrolysis of Eucalyptus grandis chips for microbial production of xylitol*. **Process Biochemistry** 33: 63-67, 1998.
22. Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant NO. *The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood*. **Enzyme and Microbial Technology** 24: 151-159, 1999.
23. Tran AV, Chambers RP. *Ethanol Fermentation of Red Oak Acid Prehydrolysate by the yeast Pichia stipitis CDB 5776*. **Enzyme Microbiology and Technology** 8: 439-444, 1985.
24. Ferrari MD, Neirotti E, Albornoz C, Saucedo E. *Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering** 40: 753-759, 1992. Felipe MGA, Vitolo M, Mancilha IM. *Xylitol formation by Candida guilliermondii grown in a sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate: effect of aeration and inoculum adaptation*. **Acta Biotechnologica** 16: 73-79, 1996. Clark TA, Mackie KL. *Fermentation Inhibitors in Wood Hydrolysates*
25. *Derived from the Softwood Pinus radiata*. **Chemical Technology and Biotechnology** 34: 101-110, 1984.
26. *Fengel D, Wegener G. Wood chemistry ultrastructure reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 613, 1989.
27. Acosta EM, Silva SS, Felipe MGA. *Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred-tank reactor fermentation*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 84-86: 633-637, 2000.
28. Rodrigues RCLB, Felipe MGA, Almeida e Silva JB, Vitolo M, Gómez PV. *The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** 18: 299-311, 2001.
29. Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM. *Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extrated with organic solvents*. **Process Biochemistry** 32: 599-604, 1997.
30. Perry RH, Green DW. **Perry's Chemical Engineering Handbook**. Seven edition, Mcgraw-Hill, New york, USA, 1997.
31. Côrrea MP. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional 1: 475-482, 1926-1978.