

AVALIAÇÃO DO HIDROLISADO DE CAVACOS DE EUCALIPTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS

Giovani B Mafra de Carvalho ¹, Yovanka P Ginoris ¹, Elisângela de J Cândido ¹, Larissa Canilha ¹, Walter Carvalho ¹ e João B Almeida e Silva ¹

¹Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Rodovia Itajubá-Lorena, Km 74,5, Lorena, SP-Brasil CEP: 12600-970, tel: +(12)5533422; fax: +(12)5533133

Palavras-chave: cavacos de eucalipto, hidrolisado, concentração

Área do Conhecimento: II Ciências Biológicas

Resumo- Cavacos de eucalipto da espécie *Eucalyptus grandis* foram submetidos à hidrólise ácida resultando em um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis, sobretudo xilose, substrato primordial para o processo de obtenção de xilitol. A partir deste hidrolisado estudou-se a sua concentração utilizando evaporador a vácuo, bem como o efeito desta concentração, nas características do hidrolisado. Constatou-se que o teor de xilose (24,32 g/L) aumentou proporcionalmente com os fatores de concentração de 2,5 e 4,5 vezes (64,20 e 108,40 g/L, respectivamente).

Introdução

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

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]. A lignina é composta de um conjunto de polímeros amorfos reticulares de alta massa molecular, geralmente associado com a celulose e a hemicelulose, composta por anéis de benzeno que contêm grupos fenólicos livres e metilados [1]. As hemiceluloses são polímeros ramificados compostos de polissacarídeos de baixa massa molecular [2]. 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 [2]. O principal componente da fração hemicelulósica dos resíduos agro-industriais é a xilana, polímero constituído por unidades de xilose que pode ser hidrolisada usando-se ácidos minerais [1].

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 [3]. O objetivo do presente trabalho foi de avaliar o hidrolisado de cavaco de eucalipto obtido por hidrólise ácida, em diferentes concentrações, afim de aumentar o teor de xilose, substrato primordial em processos biotecnológicos, como a produção de xilitol.

Materiais e Métodos

Hidrólise ácida dos cavacos: Os cavacos de eucalipto foram hidrolisados em um reator de aço de 50 L de capacidade útil. A hidrólise foi realizada conforme metodologia estabelecida por Almeida e Silva *et al.* [4], de acordo com as seguintes condições: relação água para massa seca de madeira de 1:4,5; temperatura de 156 °C; tempo de reação de 27 minutos 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 4 L de capacidade útil, operando a ± 70 °C. O hidrolisado concentrado foi caracterizado quanto a pH, concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e compostos derivados da degradação da lignina.

Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, furfural e HMF: As concentrações de açúcares e inibidores foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu-LC-10AD.

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 [5].

A concentração de lignina foi calculada por meio da Equação a seguir, 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/L)

A_{LIG280} = absorvância da solução em 280 nm

$A_{PD280} = C_1 \times \varepsilon_1 + C_2 \times \varepsilon_2$; onde C_1 , C_2 = concentrações de furfural e HMF determinadas por HPLC; ε_1 , ε_2 = coeficientes de extinção do furfural (146,85 L/g·cm) e do HMF(114,00 L/g·cm).

Resultados

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

TABELA 1. Composição parcial do hidrolisado de eucalipto obtido por hidrólise ácida, em sua forma original e após ser submetido à concentração.

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

* FC - Fator de Concentração

**HMF - 5-Hidroximetilfurfural.

*** CDL - compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em ácido e dos extrativos da madeira.

Discussão

Observa-se na Tabela 1 que a xilose (24,32 g/L) é o açúcar predominante no hidrolisado. A glicose (1,53 g/L) e a arabinose (0,53 g/L), estão presentes em baixas concentrações conforme já constatado nos hidrolisados hemicelulósicos de eucalipto [4, 6, 7], de bagaço de cana-de-açúcar [8] e de palha de arroz [9].

Tem sido constatado que a predominância de 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 [10], sendo esta inibição

dependente da concentração dessa hexose no meio de fermentação [11].

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 do metabolismo de leveduras. Os compostos tóxicos caracterizados neste trabalho foram o furfural, o 5-hidroximetilfurfural, o ácido acético, assim como os compostos aromáticos de baixa massa molar oriundos da degradação da lignina e dos extrativos da madeira.

O teor de ácido acético encontrado no hidrolisado (Tabela 1) foi similar ao valor obtido por Almeida e Silva *et al.* [4] (5,40 g/L), ao submeter cavacos de eucalipto da mesma espécie nas mesmas condições hidrolíticas utilizadas neste estudo, enquanto que, o valor de furfural foi superior (2,10 g/L) ao deste trabalho.

Tem sido observado que a concentração desses compostos nos hidrolisados hemicelulósicos varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidrolíticas empregadas para a extração da fração hemicelulósica [12]. Desta forma têm sido relatada a presença de ácido acético nos hidrolisados de diferentes tipos de madeiras, em concentrações na ordem de 12,0 g/L [13] e 10,0 g/L [14] para os hidrolisados de carvalho vermelho, e de até 24,3 g/L no hidrolisado de eucalipto [15].

Nota-se ainda na Tabela 1 que o hidrolisado obtido contém um grupo de compostos aromáticos de baixa massa molar. Conforme relatado por Clark e Mackie [16], 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 deste modo, a solubilização de compostos monoméricos. Os teores desses compostos encontrados no hidrolisado (1,41 g/L) foi similar ao valor encontrado por Canettieri *et al.* [7] (1,25 g/L), também em hidrolisado de eucalipto obtido pelo mesmo procedimento de hidrólise.

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 (0,54 g/L) foi similar ao valor obtido por Parajó *et al.* [6] (0,50 g/L) 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 Fengel e Wegener [17] deve-se à degradação parcial da xilose à 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 *et al.* [18] 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 *et al.* [19] 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.* [20] 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 de 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 [21] o que possibilita a sua remoção quase total nas condições de temperatura (± 70 °C) e pressão utilizadas neste trabalho. Uma redução considerável do teor deste composto foi também observada por Canettieri *et al.* [7] após concentrar o hidrolisado de eucalipto a 3 e 4 vezes de sua concentração inicial.

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 notáveis e hidrossolúveis [21], 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 [21] e também do ácido acético presente no hidrolisado.

Os resultados deste trabalho demonstraram 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 ocorra perda substancial de xilose neste hidrolisado, substrato primordial para o processo de obtenção de xilitol.

Agradecimentos: Os autores agradecem os apoios financeiros: FAPESP, CAPES e Cnpq.

Referências

- [1] KHUAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Crit.Rev.Biotechnol.** V.13, p.151-172, 1993.
- [2] PULS, J.; SCHUSEIL, J.I.N; COUGHLAN, M.P; HAZLEWOOD, G.P. Hemicellulose and Hemicellulases. Portland Press, Cambridge, p.1-27, 1993.
- [3] LOHMEIER-VOGER, E.M.; SOPHER C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **J.Ind. Microbiol.Biot.** V.20, p.75-81, 1998.
- [4] ALMEIDA e SILVA, J.B.; LIMA, U.A.; TAQUEDA, M.E.S.; GUARAGNA, F.G.; SOLENZAL, A.I.N. Use of response surface methodology for selection of nutrient levels for culturing *Paecilomyces variotii* in eucalyptus hemicellulosic hydrolysate **BioresourceTechnol.** V.87, p.45-50, 2003.

- [5] ROCHA, G.J.M. Designificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio. 2000. 136p. Tese (Doutorado) - São Carlos, São Paulo, IQSC/USP, 2000.
- [6] PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Charcoal Adsorption of Wood Hydrolysate for Improving their Fermentability: Influence of the Operational Conditions. **BioresourceTechnol.** V.57, p.179-185, 1996.
- [7] CANETTIERI, E.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Rev.Brasil.Ciênc.Farmacêut.** V.38, p.323- 331, 2002.
- [8] ALVES, L.A. Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol. 1997. 100p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)-Lorena, São Paulo,FAENQUIL/DEBIQ, 1997.
- [9] ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SOUZA, C.M.A.; FELIPE, M.G.A.; SATO, S.; CASTRO, H.F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnol.Lett.** V.16, p.1211-1216, 1994.
- [10] GÍRIO, F.M.; AMARO, C.; AZINHEIRAL, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaromyces hansenii*. **BioresourceTechnol.** V.71, p.245-251, 2000.
- [11] FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xilitol by *Candida guilliermondii*. **J.BasicMicrob.** V.35, p.171-177, 1995.
- [12] SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; PRATA, A.M.R. Acid hydrolysis of *Eucalyptus grandis* chips for microbial production of xylitol. **ProcessBiochem.** V.33, p.63-67, 1998.
- [13] TRAN, A.V.; CHAMBERS, R.P. Ethanol Fermentation of Red Oak Acid Pre-hydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CDB 5776. **EnzymeMicrob.Tech.** V.8, p.439-444, 1985.
- [14] FERRARI, M.D.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicelullose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnol.Bioeng.** V.40, p.753-759, 1992.
- [15] FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate: effect of aeration and inoculum adaptation. **ActaBiotechnol.** V.16, p.73-79, 1996.
- [16] CLARK, T.A. e MACKIE, K.L. Fermentation Inhibitors in Wood Hydrolysates Derived from the *Softwood Pinus radiata*. **Chem.Technol.Biotech.** V.34, p.101-110, 1984.
- [17] FENGEL, D. e WEGENER, G. Wood chemistry ultrastructure reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.
- [18] ACOSTA, E.M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred-tank reactor fermentation. **Appl.Biochem.Biotech.** V.84-86, p.633-637, 2000.
- [19] RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate cocentration on the removal of volatile and compunds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with actived charcoal before or after vacuum evaporation. **Braz.J.Chem.Eng.** V.18, p.299-311, 2001.
- [20] PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extrated with organic solvents. **ProcessBiochem.** V.32, p.599-604, 1997.
- [21] PERRY, R.H. e GREEN, D.W. Perry's Chemical Engineering Handbook. Seven edition, Mcgraw-Hill, New york, USA, 1997.