

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE ESPÉCIES MADEIREIRAS AMAZÔNICAS

Bolsista: Verena Makarem Soares, FAPEAM

MANAUS – AM

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Relatório Final

PIB-B/0047/2013

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DE HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE ESPÉCIES MADEIREIRAS AMAZÔNICAS

Bolsista: Verena Makarem Soares, FAPEAM

Orientador: Prof. Msc. Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos

Manaus – AM

2014

Sumário

1. INTRODUÇÃO	4
2. JUSTIFICATIVA	5
3. OBJETIVOS	5
3.1. OBJETIVO GERAL	5
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	5
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
6. CONCLUSÕES.....	8
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de madeira tropical do mundo, estando atrás apenas dos países asiáticos Malásia e Indonésia (HUMELL et al., 2010). Dentro do mercado brasileiro, a região amazônica responde por 75% da produção (AMARAL et al., 1998). Segundo Lucas Filho et al. (2010), estima-se que 50% de todo estoque de madeira tropical do mundo encontra-se nesta região.

Segundo Humell et al. (2010), em 2009 o estado do Amazonas produziu 367 mil metros cúbicos de madeira em toras. Admitindo os mesmos percentuais observados para toda a Amazônia legal, cerca de 60% da madeira extraída é categorizada como entulho, das quais cerca de 15% são queimadas ou abandonadas. Estes resíduos podem ser utilizados para obtenção de hidrolisado hemicelulósico, a partir do qual podem ser produzidas diversas substâncias com valor de mercado como proteína celular microbiana (usada na alimentação animal), etanol (combustível) e xilitol, um açúcar-álcool que pode ser empregado como adoçante em alimentos destinados a diabéticos (SAHA, 2003). A transformação dos resíduos em matéria-prima para obtenção de produtos com valor de mercado pode elevar a rentabilidade da indústria madeireira, levando a um aproveitamento mais eficiente da madeira extraída.

Resíduos agrícolas e industriais (indústria madeireira, de celulose e papel, por exemplo) são substratos utilizáveis pelos microrganismos fermentadores. A utilização destes para produção de etanol reduziria a liberação de resíduos sólidos para o meio ambiente e seria interessante do ponto de vista econômico, devido ao baixo custo dos resíduos. Resíduos agrícolas de vegetais amplamente cultivados, como soja (*Glycine max* L.) e milho (*Zea mays* L.), bem como os da extração de madeira podem servir de matéria-prima para obtenção de substratos à fermentação alcoólica (MONIRUZZAMAN et al. 1997; SCHIRMER-MICHEL et al. 2007; SILVA et al., 2011).

A hemicelulose é um heteropolímero de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares ácidos. É o segundo mais importante polissacarídeo estrutural dos vegetais superiores, sendo menos abundante apenas que a celulose. A proporção de cada carboidrato na hemicelulose também é variável, mas a xilose ocupa sempre lugar de destaque. De acordo com o tipo de hidrólise e com o procedimento empregado na desintoxicação, a proporção de xilose em relação aos açúcares totais presentes em hidrolisados hemicelulósicos pode oscilar de 56 (CHENG et al., 2007) a até 82% (HERNANDEZ-SALAS et al., 2009). Os processos de hidrólise visam à sacarificação, isto é, a liberação dos monossacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica para sua posterior fermentação. A hidrólise pode ser feita por tratamento térmico (± 190 °C); enzimático, pela ação de hemicelulases; ou pela adição de ácidos inorgânicos diluídos, com temperaturas entre 90 e 130 °C.

A obtenção de hidrolisado hemicelulósico de madeira que seja fermentescível por leveduras poderá lançar fundamentos para obtenção de bioprocessos em trabalhos posteriores.

2. JUSTIFICATIVA

A atividade madeireira é de grande importância para a Amazônia como um todo, especialmente para o Amazonas. Por representar um risco à integridade das florestas, a extração madeireira é vista com apreensão por diversos segmentos da população e da comunidade científica. Considerando que no Amazonas existem pelo menos 55 mil metros cúbicos de resíduos de madeira que podem ser aproveitados para obtenção de etanol de segunda geração, xilitol e outros produtos (ora fora do escopo deste projeto), e que este potencial segue inexplorado, observa-se que o desenvolvimento deste projeto poderá agregar valor a uma matéria prima abundante que segue desperdiçada, conduzindo a um maior aproveitamento da madeira e tornando desnecessário o aumento do extrativismo para elevação dos lucros.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Obter hidrolisado hemicelulósico de resíduos da atividade madeireira no Amazonas, avaliando a fermentabilidade deste por leveduras.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter hidrolisado hemicelulósico de resíduos de madeira por hidrólise ácida;
- Caracterizar os hidrolisados obtidos;
- Determinar condições ótimas para maior rendimento de açúcar redutor total.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados resíduos de madeira das espécies *Dinizia excelsa* Ducke, popularmente conhecida como Angelim e *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. F. ex K. Schum, conhecido como Mulateiro. A hidrólise ácida foi conduzida conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2011). Os resíduos foram triturados (partícula <2,0 mm) e desidratados em estufa a 70°C até obtenção de peso constante. Em seguida, o mesmo foi submetido a tratamento para hidrólise seguindo delineamento central composto rotacional (DCCR), conforme as tabelas 01 e 02. Foram variáveis de resposta: a concentração de açúcares redutores totais e o rendimento de açúcar redutor. Foram obtidos, ao final, 11 hidrolisados oriundos de 11 experimentos.

As misturas, conforme detalhamento da tabela 02, foram submetidas a tratamento térmico por autoclavagem (121 °C / 45 minutos), sendo prensadas (até 15 toneladas) para separação das fases sólida e líquida. A fase líquida foi neutralizada com Ca(OH)_2 e seu conteúdo submetido a análise para caracterização.

Variáveis	Níveis das variáveis		
	-1	0	+1
Concentração de ácido sulfúrico (% v/v)	1%	2%	3%
Razão sólido:líquido (g:mL)	1 : 3	1 : 2,25	1 : 1,5

Tabela 01 - Planejamento fatorial seguindo o delineamento central composto rotacional (DCCR).

Ensaio	Concentração de ácido sulfúrico (%)	Razão sólido:líquido (g/mL)
01	1%	1 : 3
02	1%	1 : 1,5
03	3%	1 : 3
04	3%	1 : 1,5
05	0,58%	1 : 2,25
06	3,41%	1 : 2,25
07	2%	1 : 3,31
08	2%	1 : 1,18
09	2%	1:2,25
10	2%	1:2,25
11	2%	1:2,25

Tabela 02 - Planejamento fatorial para obtenção de hidrolisado hemicelulósico de resíduos de madeira.

A concentração de cada açúcar obtido nos processos de hidrólise foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando coluna Phenomenex ® com fase amina e contra-íon Pb^{2+} , usando cromatógrafo da central analítica do Centro de Biotecnologia do Amazonas (CBA).

A concentração de açúcares redutores totais (ART) do hidrolisado hemicelulósico foi determinada pelo método Ácido 3, 5 - Dinitro-Salicílico (DNS), conforme descrito por Zhao et al. (2008). Foram adicionados 200 µL da amostra (diluída 100x) a 300 µL de DNS, submetendo à fervura por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 1500 µL de água destilada. A absorbância da solução foi analisada em espectrofotômetro a 540 nm, determinando-se a concentração de ART (g/L) conforme curva padrão (figura 1).

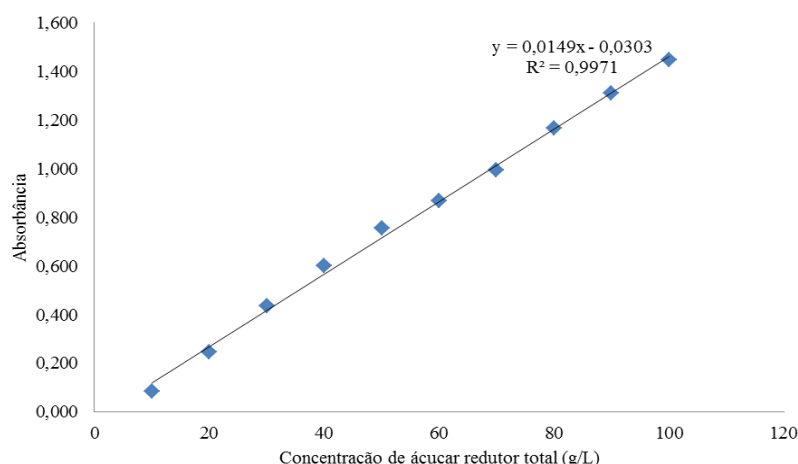


Figura 1: Curva padrão de açúcar redutor total pelo método DNS (ABS = 0,0149. [ART g/L] – 0,0303)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do hidrolisado hemicelulósico de Mulateiro obtido está descrita na tabela 03. O açúcar D-xilose foi o açúcar mais abundante apresentando uma média de 8,915455 g/L extraído. Logo em seguida encontram-se Glicose com 3,422727 g/L, Galactose com 2,711818 g/L e Arabinose com 2,61 g/L. A Sacarose foi o açúcar que se apresentou menos abundante, com produção média de 0,117273 g/L, menor do que a obtida em ensaios anteriores com cana-de-açúcar usando o mesmo planejamento fatorial.

Amostras Hidrolisadas	Furfural (uL/mL)	Hidroxi-furfural (uL/mL)	Ácido tânico (mg/100mL)	Ácido acético (uL/mL)	Arabinose (mg/mL)	D-xilose (mg/mL)	Galactose (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Etanol (uL/mL)	Sacarose (mg/mL)	Xilitol (mg/mL)
01	2,27	10,97	20,86	N.D.	3,47	11,15	1,79	6,13	N.D.	0,48	N.D.
02	9,67	1,66	21,25	N.D.	3,79	19,35	4,97	4,55	N.D.	0,23	N.D.
03	3,96	10,33	20,33	N.D.	1,79	N.D.	0,85	2,30	N.D.	0,07	N.D.
04	26,28	16,58	21,27	N.D.	1,83	N.D.	2,88	3,21	N.D.	N.D.	N.D.
05	15,46	25,33	20,72	N.D.	4,62	22,56	5,22	6,64	N.D.	N.D.	N.D.
06	6,75	11,52	19,08	N.D.	1,11	N.D.	0,62	2,22	N.D.	N.D.	N.D.
07	1,84	7,14	19,57	N.D.	1,96	N.D.	0,59	1,53	N.D.	0,28	N.D.
08	27,12	23,36	22,73	N.D.	3,58	N.D.	4,58	4,43	N.D.	0,06	N.D.
09	19,17	22,71	21,27	N.D.	2,44	16,60	3,70	0,32	N.D.	0,06	N.D.
10	15,98	17,57	22,53	N.D.	2,00	14,48	2,62	3,28	N.D.	0,05	N.D.
11	0,74	13,60	14,64	N.D.	2,12	13,93	2,01	3,04	N.D.	0,06	N.D.

Tabela 03 – Composição do hidrolisado hemicelulósico de Mulateiro analisado em cromatógrafo da central analítica do Centro de Biotecnologia do Amazonas (CBA). Legenda: N.D.=não detectado.

Tomando-se como variável de resposta a dosagem de ART, as concentrações obtidas em cada ensaio, se encontram na tabela 04.

Ensaio	Absorbância			ART (g/L)
01	0,265	0,296	0,284	20,91
02	0,496	0,455	0,473	33,89
03	0,123	0,110	0,109	9,68
04	0,312	0,259	0,276	20,98
05	0,466	0,427	0,467	32,46
06	0,181	0,166	0,170	13,60
07	0,067	0,056	0,062	6,17
08	0,410	0,427	0,420	30,15
09	0,407	0,409	0,433	29,98
10	0,409	0,366	0,343	27,04
11	0,322	0,304	0,319	23,17

Tabela 04 – Concentração de açúcares redutores totais (ART) do hidrolisado hemicelulósico de Mulateiro, determinada pelo método Ácido 3,5-Dinitro-Salicílico (DNS).

A análise estatística, indicou que o fator com maior efeito significativo sobre a concentração de ART foi a concentração de ácido sulfúrico (figura 02). Houve efeito significativo da razão sólido : líquido mas com efeito negativo, indicando que quanto maior a razão sólido : líquido, menor a concentração de ART.

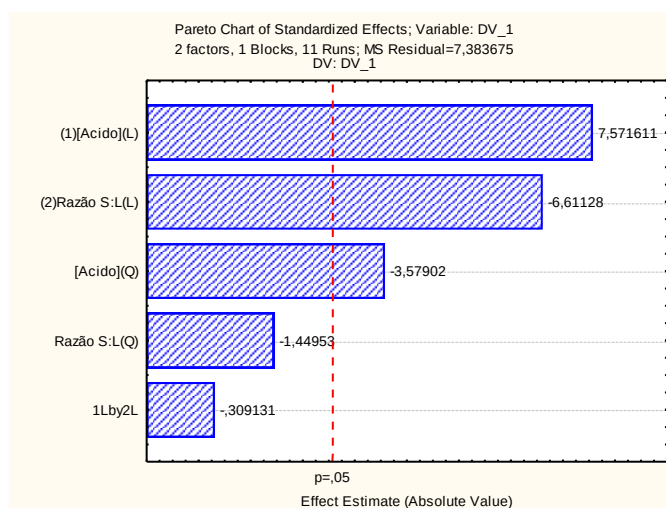


Figura 2: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados, indicando a variável “concentração de ácido” como a de maior efeito significativo, e efeito negativo da variável “razão sólido : líquido”.

As maiores concentrações de ART foram obtidas em valores a partir de 2,25% de ácido sulfúrico, combinados a menores valores de razão sólido : líquido, conforme apresentado na figura 3.

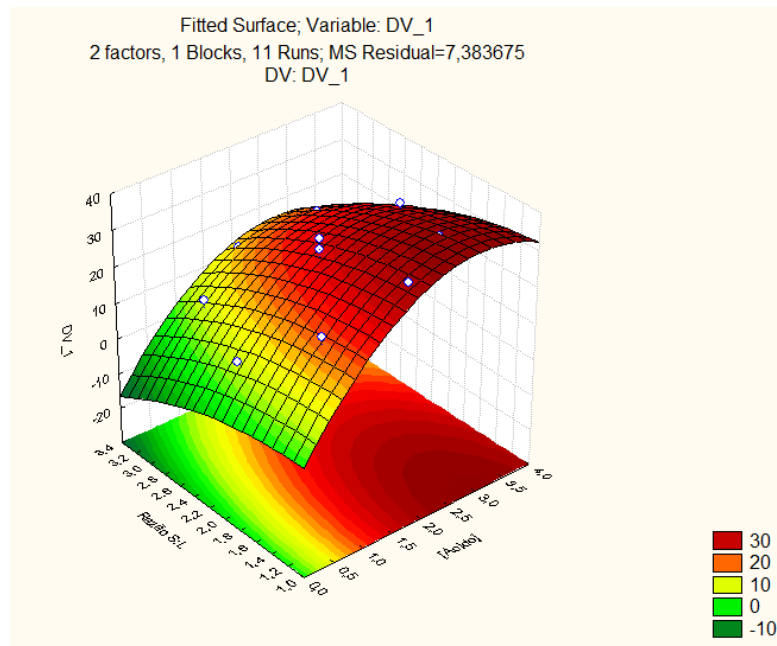


Figura 3: Gráfico de superfície de resposta, evidenciando maiores valores de ART em função da concentração de ácido sulfúrico e razão sólido : líquido.

Tomando-se como parâmetro o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (HACA), o mais empregado em processos fermentativos, a hidrólise de Mulateiro apresentou baixo rendimento de açúcar, indicando sua inviabilidade para a fermentação. As concentrações de D-xilose em HACA, por exemplo, chegam a ser de 52,46 g/L (Matos et al., dados não publicados), enquanto o valor máximo obtido na hidrólise de mulateiro foi 22,56 g/L, indicando baixo potencial deste para hidrólise ácida.

A hidrólise ácida de Angelim foi realizada, mas devido a problemas com a coluna Phenomenex [®] não pôde ser feita a análise dos açúcares e componentes do mesmo.

6. CONCLUSÕES

A hidrólise ácida de Mulateiro apresentou baixo rendimento de açúcar, indicando sua inviabilidade para fermentação.

A variável “concentração de ácido” foi a mais significativa para o processo de hidrólise, havendo efeito negativo da variável “razão sólido : líquido”.

Novos esforços devem ser empreendidos no intuito de viabilizar a obtenção de substratos lignocelulósicos alternativos a fermentação alcoólica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, P.; Veríssimo, A.; Barreto, P.; Vidal, E. 1998. **Floresta para Sempre: um Manual para Produção de Madeira na Amazônia**. Belém: Imazon. 130 pp.
- Cheng, K.; Ge, J.; Zhang, J.; Ling, H.; Zhou, Y.; Yang, M.; Xu, J. 2007. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. In **Biotechnol lett**. Nº 29, p. 1051-1055.
- Hernández-Salas, J.M.; Villa-Ramírez, M.S.; Veloz-Rendón, J.S.; Rivera-Hernández, K.N.; González-César, R.A.; Plascencia-Espinosa, M.A. e Trejo-Estrada, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology** 100: 1238–1245. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.062
- Hummel, A. C.; Alves, M. V. S.; Pereira, D.; Veríssimo, A. V.; Santos, D. 2010. **A atividade madeireira na Amazônia brasileira: produção, receita e mercados**. Belém, PA: Serviço Florestal Brasileiro (SFB); Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia (Imazon), 20 pp.
- Lucas Filho, F. C.; Pio, N. S.; Ferreira, D. R. 2010. Método QFD como Ferramenta para Desenvolvimento Conceitual de Produtos de Madeiras da Amazônia. **Acta Amazonica**. Vol. 40(4):675 – 686.
- Moniruzzaman, M.; Dien, B. S.; Skory, C. D.; Chen, Z. D.; Hespell, R. B.; Ho, N. W. Y.; Dale, B. E.; Bothast, R. J. Fermentation of corn fibre by an engineered xylose utilizing *Saccharomyces* yeast strain. In **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Nº 13, p. 341-346, 1997.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial and Microbiology and Biotechnology**. Nº 30, p. 279–291.
- Schirmer-Michel, A. C.; Flores, S. H.; Hertz, P. F.; Matos, G. S.; Ayub, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**. Nº 99, p. 2898–2904, 2007.
- Silva, N. L. C.; Betancur, G. J. V.; Vasquez, M. P.; Gomes, E. B.; Pereira Jr, N. 2011. Ethanol Production from Residual Wood Chips of Cellulose Industry: Acid Pretreatment Investigation, Hemicellulosic Hydrolysate Fermentation, and Remaining Solid Fraction Fermentation by SSF Process. **Appl Biochem Biotechnol**. 163: 928–936. DOI 10.1007/s12010-010-9096-8
- Soares, V. M.; Belota, A. G.; Astolfi-Filho, S.; Medeiros Galvão, R. S.; Matos, I. T. S. R. (2013). Obtenção de hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana-de-

açúcar para produção de biomassa microbiana por *Meyerozyma guilliermondii*. In: Anais. **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Foz do Iguaçu, Brasil. São Paulo: Sociedade Brasileira de Engenharia Química. p. 1-5.

Zhao, L., Yu, J., Zhang, X., Tan, T. 2008. The Ethanol Tolerance of *Pachysolen tannophilus* in Fermentation on Xylose. **Appl Biochem Biotechnol**. DOI: 10.1007/s12010-008-8308-y.