

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EMPREGO DE TERMOSSEPARAÇÃO NA DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO DE BIOMASSA VEGETAL EMPREGADO NA OBTENÇÃO DE PRODUTO BIOTECNOLÓGICO

Santos, V. C.¹; Hasmann, F. A.¹; Pessoa-Jr., A.²; Roberto, I.C.¹

¹USP - Escola de Engenharia de Lorena/Departamento de Biotecnologia, Rodovia Itajubá-Lorena, km 74,5, CP 116, Lorena/SP, Brasil.
lela@alunos.fauenquil.br

²USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Departamento de Tecnologia Bioquímica- Av. Prof. Lineu Prestes, n. 550 CP. 66083, São Paulo/SP, Brasil

Resumo- Compostos fenólicos, produtos de degradação, são formados pelo processo de hidrólise de materiais hemicelulósicos, tais como a palha de arroz. Estes hidrolisados podem ser transformados através de bioprocessos em produtos úteis, como o xilitol. A remoção dos fenólicos melhora a eficiência do processo e possibilita a recuperação destes compostos, os quais apresentam grande potencial para utilização em produtos farmacêuticos. A termosseparação dos fenólicos, presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, empregando copolímeros termosensíveis do tipo: PEO-PPO-PEO (poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)) foi estudada. Os resultados revelam que a técnica empregada não removeu quantidades significativas dos açúcares. Ao final do processo fermentativo, verificou-se que o consumo de glicose não foi afetado. No entanto, a concentração final de xilitol variou de 12,05g/L a 14,46g/L, devido ao menor consumo de xilose observado (51,56% a 59,17%).

Palavras-chave: Sistemas aquosos bifásicos; Copolímeros termosensíveis; Resíduos agroindustriais; Compostos fenólicos; Xilitol.

Área do Conhecimento: Engenharias

Introdução

Resíduos florestais e agrícolas são abundantes, renováveis e fontes de energia barata. Atualmente, a maior parte destes materiais é empregada como aditivos de ração animal, mas pesquisas acadêmicas e industriais estão esforçando-se para a obtenção de produtos de maior valor agregado, tais como o xilitol, que é um adoçante anticariogênico apropriado para diabéticos e obesos, com menores perdas a partir destes resíduos (FAULDS *et al.* 1997).

Estes resíduos são essencialmente substâncias lignocelulósicas constituídas de carboidratos e compostos fenólicos naturais. Os carboidratos quando hidrolisados podem liberar resíduos de açúcares tais como arabinose, D-glicose e principalmente, D-xilose. No entanto, além destes, liberam componentes oriundos da degradação de lignina, tais como os compostos fenólicos. A presença destes compostos durante os processos de bioconversão, afeta negativamente a sua eficiência, pois alguns são tóxicos aos microrganismos inibindo o metabolismo.

Recentes estudos clínicos destes compostos fenólicos atribuíram a este grupo uma ação potencialmente imunoestimuladora. Estes compostos promovem a indução de plantas à fagocitose e em seres humanos; à síntese de

interferons e produção de anticorpos. Adicionalmente, possuem propriedades antiviral, antibacteriana, antiinflamatória e antioxidante (ZGÓRKA e KAWKA, 2001). Desta forma, um método prático e confiável para a separação destes compostos é de considerável interesse.

A remoção destes compostos do hidrolisado hemicelulósico, ou seja, sua destoxificação, tem sido feita por diferentes técnicas, por exemplo: ajuste de pH, emprego de lacases, uso de resinas de exclusão iônica, empregando adsorção com carvão ativado, etc. Estes métodos foram descritos como resultantes em produtividades mais elevadas (maior fermentabilidade) nos bioprocessos através da remoção dos inibidores (fenólicos). O tratamento com lacases e resinas de exclusão iônica, por exemplo, pode conduzir à diminuição de mais de 80% dos fenólicos totais, mas não são métodos praticáveis, devido aos custos. O tratamento de ajuste de pH foi descrito também como um método de bons resultados; entretanto a concentração de fenólicos diminuiu somente ao redor de 20% (LARSSON *et al.* 1999; MUSSATO *et al.* 2004). Outras técnicas as quais apresentam elevados custos podem ser empregadas como: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em fase reversa (POMPONIO *et al.* 2002).

Dentro deste contexto, o desenvolvimento de novas técnicas para remoção destes compostos

fenólicos, para obter-se uma melhor eficiência na bioconversão, a um custo mais baixo, oferecendo ainda a possibilidade de reutilização dos fenólicos, apresenta grande interesse.

Recentemente, as propriedades dos copolímeros termosseparáveis e suas aplicações em SAB (sistemas aquosos bifásicos) vêm sendo investigadas para utilização destes sistemas na extração de biomoléculas. Quando estes polímeros são aquecidos acima de uma temperatura crítica, conhecida como temperatura de *cloud-point*, a solubilidade do copolímero diminui e um sistema composto de duas fases (polímero e água) é formado. A temperatura induz a separação de fases, fazendo a possível partição da molécula entre as fases e conseqüentemente, facilitando o reciclo do copolímero.

Dentre os exemplos de copolímeros termosseparáveis podem ser citados: aleatório, dibloco e tribloco, hidrofóbicos, como poli (óxido de propileno) (PPO) e hidrofílicos, como poli (óxido de etileno) (PEO). O comportamento do copolímero em solução depende da porcentagem do polímero no sistema, massa molecular e tamanho do bloco PEO e PPO. A quantidade de PEO e PPO pode ser expressa em porcentagem mássica, porcentagem molar ou tamanho do bloco. A taxa de dissolução diminui com o aumento da massa molecular do grupo de copolímero com a mesma composição de PPO/PEO.

Com o uso de copolímeros termosseparáveis têm-se a possibilidade de combinar a partição em sistemas aquosos bifásicos com a temperatura de indução de separação de fases. Muitas pesquisas apresentaram resultados satisfatórios utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros termosseparáveis. Estes estudos mostram a facilidade de recuperar o copolímero, o que é vantajoso, pois diminui os custos do processo (ALRED *et al.* 1994; WALTER, H., JOHANSSON G. 1994; FRANCO *et al.* 1997; RABELO *et al.* 2004). Além disso, uma vantagem do emprego destes copolímeros, é a possibilidade de purificação de diferentes moléculas.

O emprego desta técnica na remoção de fenólicos consiste de uma inovação tecnológica e os resultados obtidos neste trabalho, mostram que o emprego deste SAB é promissor como método de remoção de fenólicos.

Materiais e Métodos

Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico e Processo Fermentativo

Para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico, a palha de arroz seca e moída (1 cm de comprimento e 1 mm de espessura) foi submetida a hidrólise ácida em bioreator de aço inoxidável com capacidade de 120L, empregando 3,5kg

(massa seca) de palha de arroz e 35L de solução de ácido sulfúrico, com um tempo de residência de 30 min a 121°C. Nesta condição a concentração de xilose presente no meio é de cerca de 20g/L. Para obtenção do hidrolisado concentrado, ao final da hidrólise acima descrita, o material líquido foi concentrado em um evaporador de 4L de capacidade a 70°C ($\pm 5^\circ\text{C}$), para obtenção de uma concentração final de xilose de aproximadamente 100g/L (densidade de 1,16g/mL).

Preparou-se um controle usando meio semi-sintético empregando *Candida guilliermondii*, cultivada em frascos Erlenmeyer com a seguinte composição: 100g/L xilose; 3g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 20g/L extrato de farelo de arroz, em água deionizada.

Fermentação Extrativa e Destoxificação do Hidrolisado

Para a realização do processo fermentativo, o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz teve seu pH ajustado em 5,0 com a adição de NaOH sólido.

Dois grupos de experimentos foram realizados. No primeiro, correspondentes aos ensaios de fermentação extrativa, foram adicionados 20 mL de hidrolisado a frascos Erlenmeyers (de 50mL) e 4mL (20%v/v) de copolímero 1100g/mol. Seguiu-se a inoculação com 1g/L de células e condução do processo fermentativo (ensaios 1 e 2) nos quais os copolímeros foram mantidos nos frascos durante todo o processo conduzido a 30 °C, 200 rpm (agitador orbital) por 72 horas. No segundo grupo, correspondente ao processo fermentativo conduzido após destoxificação do hidrolisado (ensaios 3 e 4), o qual foi misturado a 20%v/v de copolímero 1100g/mol, empregando vórtice por 5 min. A seguir o sistema foi deixado em repouso por 2 horas para que o ocorresse a separação em duas fases e a partição (remoção) dos compostos fenólicos. Após a remoção da fase polimérica, o hidrolisado destoxificado foi inoculado com 1g/L de células e incubado em agitador orbital a 30 °C, 200 rpm por 72 horas.

Metodologia Analítica

Amostras foram coletadas nos tempos inicial e final de fermentação para determinação da concentração celular, de açúcares e de xilitol. A primeira foi determinada por espectrofotometria, enquanto que as demais concentrações foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).

Resultados

Na Tabela 1 são mostrados os resultados de concentração celular obtidos antes e após o processo fermentativo. Os ensaios 1 e 2 correspondem aos ensaios de fermentação

extrativa, e os ensaios 3 e 4, nos quais o copolímero foi removido antes do início da fermentação. É apresentada também a concentração celular do controle preparado em meio semi-sintético.

Tabela 1 – Concentração celular de *Candida guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético e em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado por copolímeros termosensíveis

Concentração Celular (g/L)					
	Controle	1	2	3	4
0 h	1,19	1,53	1,41	0,99	1,42
72 h	7,98	3,76	5,96	10,35	10,94

*Controle: meio semi-sintético; Erro: ±6%

O bioprocesso conduzido em meio semi-sintético apresentou um aumento na concentração celular de 6,8 g/L. As maiores concentrações celulares ao final do processo fermentativo foram obtidas nos ensaios 3 e 4, nos quais o hidrolisado foi destoxificado por termosseparação. Os menores valores de concentração celular final (3,7 g/L e 5,9 g/L) foram obtidos nos ensaios empregando hidrolisado e cujo bioprocessos foi conduzido com a presença de 20% do copolímero (1 e 2).

Na Tabela 2 são mostradas as concentrações iniciais e finais dos açúcares e xilitol (no hidrolisado destoxificado e no controle).

Tabela 2 – Concentração de glicose, xilose, arabinose e xilitol durante processo fermentativo do controle empregando meio semi-sintético e hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado por copolímeros termosensíveis

Ensaio					
Composto [g/L]	Tempo 0h				
	Controle	1	2	3	4
Glicose	-	12,9	14,5	14,2	10,4
Xilose	97,7	97,1	106,2	97,1	94,7
Arabinose	-	18,9	21,3	19,7	18,1
Xilitol	-	0,6	0,6	0,6	0,6
Tempo 72 h					
Glicose	-	0,7	0,7	0,7	0,7
Xilose	8,0	51,1	54,7	53,8	55,5
Arabinose	-	20,9	20,4	21,9	20,8
Xilitol	65,5	12,9	12,1	14,5	14,1

1 e 2 – fermentação extrativa; 3 e 4 – fermentação não extrativa; Erro: ±4%

Observando-se os valores obtidos no controle, meio compostos exclusivamente de xilose, um consumo de aproximadamente 75% da xilose foi

verificado. Para os demais ensaios, a xilose variou de 97,1g/L para 51,10g/L, de 106,16g/L para 54,74g/L, de 97,10g/L para 53,79g/L e de 91,72g/L para 55,46g/L, nos ensaios 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

A concentração de glicose (ensaios 1, 2, 3 e 4) diminuiu de 12,9g/L, 14,54g/L, 14,24g/L e 10,44 g/L, respectivamente, para 0,7g/L, em todos os casos. Enquanto que as concentrações de xilitol obtidas no final da fermentação foram 12,98g/L, 12,05g/L, 14,46g/L e 14,15g/L. Em todos os casos a concentração inicial de xilitol foi de aproximadamente 0,6 g/L.

Discussão

Os resultados apresentados (Tabela 2) demonstram que a técnica empregada na destoxificação do hidrolisado, não promove remoção significativa dos açúcares presentes, uma vez que o hidrolisado *in natura* foi concentrado de modo que a concentração de xilose fosse de aproximadamente 100 g/L (t = 0h equivale ao hidrolisado destoxificado).

Com relação à glicose, observou-se um consumo em torno de 95% para todos os ensaios. Segundo AZUMA et al. (2000) determinadas concentrações desta hexose no meio de fermentação muitas vezes resultam em um pronunciado efeito catabólico sobre os microrganismos. Resultados semelhantes foram obtidos por CORTEZ (2005) que verificou após o esgotamento da glicose do meio uma produtividade maior de xilitol em detrimento do crescimento celular que se apresentou mais lento.

A concentração de arabinose por sua vez não foi alterada, as diferenças de concentrações obtidas podem ser devido aos limites de detecção do equipamento utilizado.

Observa-se empregando o hidrolisado no processo fermentativo que o crescimento celular foi fortemente influenciado pela técnica de destoxificação empregada: os ensaios 3 e 4 apresentaram ao final da fermentação concentração de células 33% maior em relação ao controle. Nestes ensaios, a destoxificação do hidrolisado removeu grande parte dos componentes fenólicos os quais são inibidores do metabolismo microbiano. HASMANN et al. (2005) empregando esta técnica verificaram remoções de até 95% dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado de palha de arroz.

Por outro lado nos ensaios 1 e 2 o crescimento celular foi aproximadamente 40% menor que o observado para o controle. Nestes ensaios, não foi feita a destoxificação prévia do hidrolisado sendo que o copolímero (a 20%) foi mantido no meio de cultivo durante o processo. Desta forma, a transferência dos fenólicos (e conseqüente destoxificação do hidrolisado) para a fase

polimérica pode não ter sido significativa, uma vez que após a agitação do sistema é necessário um período de 2 horas de repouso para que o processo de transferência de massa se complete.

Os resultados obtidos revelam que a presença do copolímero, a 20%, nos ensaios 1 e 2 e , traços, nos ensaios 3 e 4, pode ter sido a responsável pela diminuição no consumo de xilose, devido provavelmente a interferências na transferência de oxigênio. Esta limitação de oxigênio promove a restrição do processo de reoxidação de NADH, tornando esta coenzima restrita e menos disponível afetando diretamente a ação catalítica da enzima xilose redutase, que participa do passo inicial deste bioprocessos (FELIPE, 2004, CORTEZ, 2005).

Assim, avaliando-se a bioconversão de xilose em xilitol, observa-se que o bioprocessos, empregando hidrolisado de palha de arroz como substrato, apresentou uma concentração de xilose remanescente da ordem 50% para os ensaios 1, 2, 3 e 4, resultando numa menor conversão em xilitol.

Conclusão

Pode-se concluir que o uso de copolímeros como técnica de remoção de compostos fenólicos de hidrolisados é viável, possibilitando a recuperação dos compostos fenólicos presentes (inibidores). O emprego da técnica não removeu quantidade significativa de xilose dos hidrolisados, um aspecto muito desejável, pois sua concentração no meio é um fator limitante à produção de xilitol. Dessa forma, visando melhores rendimentos para o bioprocessos, novas condições de fermentação devem ser exploradas, pois a técnica estudada no presente trabalho demonstrou seu potencial tecnológico como alternativa na destoxificação dos hidrolisados.

Referências

- AIRED P.A., TJERNELD F., KOSLOWSKI A., HARRIS J.M. (1994) Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification, *Journal of Chromatography A*, 659:289-298.
- CORTEZ, E. V. Recuperação de enzimas xilanolíticas por precipitação. Lorena-SP, FAENQUIL 77p, 1998 (Dissertação de Mestrado).
- FAULDS, C.B., BARTOLOMÉ, B., WILLIAMSON, G. (1997) "Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases". *Industrial Crops and Products*, vol. 6: 367-374.
- FELIPE, M.G.A. *Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials*.

Lignocellulose Biodegradation, American Chemical Society, p.300-315, 2004

- FRANCO, T.T., GALAEV, Y.U., HATTI-KAUL R., HOLBERG N., BÜLOW L., MATTIASSON, B. (1997) Aqueous two-phase system formed by thermoreactive vinyl imidazole/vinyl caprolactam copolymer and dextran for partitioning of a protein with a polyhistidine tail. *Biotechnology Techniques*, 11:231-235.

- HASMANN, F.A., SANTOS, V.C., PESSOA-JR. A., ROBERTO, I.C., Liquid-liquid aqueous two-phase extraction using thermoseparating polymer: a new system for the phenolics removal. In: CHEMPOR-9TH International Chemical Engineering Conference, Coimbra, p. 1-6, 2005.

- LARSSON, S., REIMANN, A., NILVEBRANT, N. JÖNSSON, L.J., Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 77-79, p. 91-103, 1999.

- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolysate treatment with activated charcoal for xylitol production, *Biotechnol. Prog.*, v. 20, p, 134-139, 2004.

- POMPONIO, R., GOTTI, R., HUDAIB, M., CAVRINI V. (2002) Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to *Echinacea purpurea* plant extracts. *Journal of Chromatography A*, 945: 239-247.

- RABELO, A.P. B., TAMBOURGI, E. B., PESSOA JR, A. (2004) Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. *Journal of Chromatography B*, 807:61-68.

- WALTER, H., JOHANSSON G., *Methods in Enzymology*, vol. 228, Academic Press, Londres, 1994, pp. 600-608.

- ZGÓRKA, G.; KAWKA, S. (2001). Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 1065-1072.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.