

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA PARA A PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL

Lilian Ramos Pivetta¹, Priscila Vaz de Arruda² e Maria das Graças de Almeida Felipe³

¹ Iniciação Científica, DEBIQ, EEL/USP. Estrada Municipal do Campinho s/n, CEP 12602-810, Lorena-SP. e-mail: licapivetta@gmail.com

² Doutoranda/CAPEs, DEBIQ, EEL/USP. Estrada Municipal do Campinho s/n, CEP 12602-810, Lorena-SP. e-mail: priscilavaz_eb@yahoo.com.br

³ Professora orientadora, DEBIQ, EEL/USP. Estrada Municipal do Campinho s/n, CEP 12602-810, Lorena-SP. e-mail: mgafelipe@debiq.fauenquil.br

Resumo – Atualmente grande parte do bagaço de cana-de-açúcar gerado no setor sucro-alcooleiro é aproveitado nas próprias usinas para a geração de energia, mas existe ainda um excedente considerável deste material, o qual pode ser empregado como matéria-prima para a produção de insumos diversos. Tal aproveitamento permitirá as usinas diversificar seus produtos e contribuirá para o aproveitamento integrado desta biomassa vegetal. Um dos produtos resultantes deste aproveitamento é o xilitol, um açúcar álcool de propriedades peculiares e de grande importância nos segmentos alimentício, farmacêutico e odontológico. O uso da biotecnologia para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisados lignocelulósicos se apresenta como uma alternativa ao processo químico de sua obtenção, o qual é de custo elevado. Porém, o hidrolisado contém além dos açúcares, compostos tóxicos aos microrganismos, como ácido acético, fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural. Desta forma o presente trabalho visa o estudo de diferentes metodologias de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar de forma a contornar o problema da toxicidade deste aos microrganismos.

Palavras-chave: Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, destoxificação, carvão vegetal ativado, polímero vegetal, resinas de troca iônica.

Área do Conhecimento: II Ciências Biológicas

Introdução

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, tendo sido estimada uma produção de 469,8 milhões de toneladas para a safra 2006/2007, superior em 8,9% à safra de 2005/2006 (PROCANA, 2006). O bagaço como subproduto da indústria sucro-alcooleira, atinge aproximadamente 28% desta quantidade e sua utilização nos setores sucro-alcooleiros fica em torno de 70 a 90% (ABRABI, 2005), sendo que o restante pode ser aproveitado para outras finalidades.

Em termos de composição, o bagaço de cana é constituído por três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) que, juntas, perfazem mais de 90% da massa total. A xilose é o principal carboidrato encontrado na fração hemicelulósica, representando cerca de 80% dos açúcares totais (FELIPE, 2004).

Dentre os diferentes métodos empregados para a recuperação dos açúcares presentes na fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos, a hidrólise com ácidos diluídos tem se mostrado bastante eficiente para a hidrólise dos polímeros hemicelulósicos, sendo também rápida e simples. Segundo Silva et al. (2005), esta técnica apresenta vantagens como minimização da formação de produtos de

degradação e aumento da susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática subsequente, desde que as condições de hidrólise (temperatura, tempo de residência e concentração de ácido) sejam otimizadas.

Há de se destacar que, durante a hidrólise da hemicelulose, além dos açúcares de interesse, são gerados vários subprodutos os quais podem ser divididos em três grandes grupos de acordo com a sua origem: derivados do furano (furfural e hidroximetilfurfural), derivados da lignina (compostos fenólicos) e ácidos fracos (acético, fórmico e levulínico) (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Segundo Watson et al. (1984), estão também presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana os cátions ferro, cromo e níquel, uma vez que a utilização de reator de aço inoxidável é uma fonte em potencial de liberação desses cátions durante o preparo do hidrolisado.

Diversos trabalhos têm demonstrado que os subprodutos gerados durante a hidrólise da fração hemicelulósica de diferentes materiais afetam negativamente o metabolismo microbiano, prejudicando a conversão dos açúcares presentes nos produtos de interesse (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; RODRIGUES et al., 2001).

Diversos métodos químicos, físicos e biológicos têm sido empregados para a remoção de subprodutos presentes em hidrolisados hemicelulósicos. Entre eles, merecem destaque à adsorção em carvão vegetal ativado, a alteração de pH por meio da adição de ácidos e bases, a adsorção em resinas de troca iônica e a utilização de polímeros vegetais.

A adsorção em carvão vegetal ativado é um dos métodos mais econômicos e eficientes (MARTON, 2002). Este tratamento baseia-se na capacidade deste material de adsorver sobre sua superfície diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas por forças de Van der Waals. Estas forças são resultantes de uma atração intermolecular, de tal modo que seu potencial é, basicamente, uma função da área superficial do material. Dentre os vários materiais comumente usados em processos de adsorção física, o carvão vegetal ativado apresenta a maior área superficial, podendo variar entre 600 e 1600 m²/g, dependendo da matéria-prima empregada para sua fabricação (CONSIDINE, 1974).

O tratamento baseado na alteração do pH com álcalis e ácidos consiste na elevação do pH inicial do hidrolisado por meio da adição de um álcali. Após a remoção do precipitado formado, o pH do hidrolisado é reduzido até o pH ótimo de fermentação por meio da adição de um ácido, efetuando-se mais uma vez a remoção do precipitado formado. Este tratamento têm sido proposto como um método para a destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos (FELIPE, 2004), uma vez que promove a precipitação de compostos aromáticos e a conversão de furfural em álcool furfurílico (MARTINEZ et al., 2001), embora possa provocar degradação parcial de açúcares (AMARTEY; JEFRIES, 1996).

O tratamento dos hidrolisados com resinas de troca iônica deve-se à capacidade destas de adsorção de diversos subprodutos do hidrolisado, e também de clarificação do mesmo (CANILHA et al., 2004). Na produção de açúcar, as resinas são amplamente utilizadas para promover a descoloração e a desmineralização do caldo de cana. Estas resinas removem compostos coloridos, compostos ionizados e compostos de natureza aromática (PUROLITE, 1998). No entanto, o emprego dessa metodologia na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar acarretou em até 40% de perda de D-xilose, o que é indesejável neste bioprocessamento, além do fato das resinas serem caras e exigirem extensivas etapas de regeneração (CARVALHO JUNIOR et al., 2005).

Os polímeros a base de tanino vegetal podem ser empregados como um tratamento alternativo, a fim de remover compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico, uma vez que estes polímeros possuem capacidade de se ligar às

proteínas insolubilizando-as, além de formar complexos com metais e remover fenóis de efluentes e águas. São biodegradáveis, apresentam baixo custo e facilidade na manipulação (ACQUAQUÍMICA, 2004a, b). Em trabalhos recentes utilizando polímeros de origem vegetal, foi constatada a capacidade destes em remover valores superiores a 80% de compostos fenólicos e íons metálicos presentes no hidrolisado de bagaço de cana, sem perda significativa dos açúcares (SILVA et al., 2006).

A definição de um tratamento adequado para a remoção ou redução da concentração de compostos tóxicos aos microrganismos contribuirá para favorecer a fermentação do hidrolisado durante o processo de obtenção de xilitol por via biotecnológica.

O xilitol, um álcool pentahidroxilado (C₅H₁₂O₅) de massa molar 152,15g/mol, tem poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de polióis comuns, além de valor calórico reduzido (MANZ et al., 1973; FELIPE, 2004).

O xilitol também não participa de reações do tipo Maillard por não apresentar grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, responsáveis por escurecimento e redução do valor nutricional de proteínas, o que possibilita seu uso na indústria alimentícia no processamento de produtos em que estas reações não são desejáveis (MANZ et al., 1973).

Uma outra característica importante do xilitol é o seu metabolismo independente de insulina, tornando-o um substituto de outros açúcares na dieta de diabéticos (PEPPER; OLINGER, 1988). Este adoçante também pode ser empregado no tratamento de outras desordens metabólicas como a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e na dieta de obesos, uma vez que este exerce pequena contribuição para a formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares (MANZ et al., 1973).

Outras aplicações clínicas do xilitol têm sido descritas como, por exemplo, sua utilização na prevenção de osteoporose, relatada por Mattila, et al. (1998), bem como no tratamento de doenças respiratórias (ZABNER, 2000).

O objetivo deste trabalho é avaliar diferentes metodologias de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar de forma a contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção biotecnológica de xilitol a partir deste subproduto do setor sucro-alcooleiro.

Material e Métodos

Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado, obtido por hidrólise ácida, (RODRIGUES et al., 2001) será tratado conforme metodologias descritas:

Alteração de pH e carvão vegetal ativado

O pH inicial do hidrolisado será elevado para 7,0 com adição de CaO e reduzido para 5,5 com H₃PO₄. O hidrolisado será então submetido à adsorção em carvão vegetal ativado (1,0%), mantendo-se a mistura sob agitação de 200rpm a 60°C por 30 min. (MARTON, 2002).

Sistema de resinas de troca iônica

Será realizado em frascos Erlenmeyer mantendo-se o hidrolisado em contato com as resinas a 30°C e 200 rpm por 60 min. Serão utilizadas as seguintes resinas em série: 1) resina acrílica de troca aniônica A-860S, 2) resina macroporosa de troca aniônica A-500PS, e 3) resina macroporosa de troca catiônica C-150, respectivamente. Utilizar-se-á uma proporção de 1:2 entre volumes de resina e volume de hidrolisado. Para a regeneração das resinas aniônicas, será utilizada solução de NaOH 10%. Para a regeneração da resina catiônica, será utilizado solução de HCl 5%.

Precipitação por polímero de origem vegetal

Primeiramente o hidrolisado terá seu pH ajustado para 8,0 com CaO. Em seguida será deixado em contato com o polímero contendo 6,5-7,3% de taninos (15% v/v) a 25°C por 25 min, empregando-se frascos Erlenmeyer de 125mL agitados a 200 rpm. Para a remoção do precipitado formado o hidrolisado será centrifugado a 4000 rpm por 10 min.

A avaliação da eficácia dos métodos de destoxificação será feita a partir da determinação da redução da concentração de compostos tóxicos (ácido acético, fenóis, íons metálicos, furfural, hidroximetilfurfural), bem como da perda de açúcares e clarificação do hidrolisado.

Fermentação

Microrganismo e preparo do inóculo

Os experimentos serão realizados com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 sendo o inóculo obtido a partir do cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer 125mL contendo xilose (30g/L), (NH₄)₂SO₄ (2g/L), CaCl₂.2H₂O (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20g/L), incubados a 200rpm, 30°C por 24h. A concentração inicial de inóculo nas fermentações será de 1,0g/L de células (RODRIGUES et al, 2006).

Condições de fermentação

As fermentações serão realizadas em frascos Erlenmeyer com 50mL de meio contendo os hidrolisados tratados sob as condições estabelecidas, suplementado com os mesmos nutrientes empregados durante o preparo do inóculo, exceto a xilose. Experimento controle será realizado empregando hidrolisado não

tratado. O pH inicial será 5,5 e os frascos serão incubados a 200rpm, 30°C por 72 horas. A performance fermentativa será analisada a partir da determinação do consumo de açúcares e da formação de xilitol por cromatografia líquida, e o crescimento celular por contagem de células por turbidimetria a partir de amostras retiradas periodicamente.

Métodos Analíticos

Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e xilitol

As concentrações dos açúcares glicose, xilose e arabinose, bem como de ácido acético e de xilitol serão determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em condições previamente estabelecidas (RODRIGUES et al, 2006).

Determinação da concentração compostos tóxicos

As concentrações de furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço serão determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em condições previamente estabelecidas (RODRIGUES et al, 2006).

Os compostos fenólicos serão determinados utilizando-se o método colorimétrico de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999).

Determinação da concentração de íons

As concentrações dos elementos metálicos de interesse (cálcio, cromo, ferro, níquel e zinco) presentes no hidrolisado, serão determinadas por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama.

Perspectivas

A partir dos resultados obtidos deste trabalho espera-se desenvolver uma técnica mais eficiente de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana-de-açúcar, visando assim a melhoria da fermentabilidade do hidrolisado e da bioconversão de xilose em xilitol.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Referências

- ABRABI 2005 – **6º Congresso de Exposição das Empresas de Biotecnologia**. São Paulo – 13 a 15 de setembro de 2005.
- AMARTEY, S.; JEFRIES, T. An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolyzed hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. **World**

- Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.281-283, 1996.
- ACQUAQUÍMICA. **Produtos, Acquapol ww**. Disponível em: <http://www.seta-sa.com.br/site/acquaquimica/produto.php?codigo=65>. Acesso em 08/2004a.
 - ACQUAQUÍMICA. **Produtos, Bioclin**. Disponível em: <http://www.seta-sa.com.br/site/acquaquimica/produto.php?codigo=23>. Acesso em 08/2004b.
 - CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; SOLENZAL, A.I.N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption and ion-exchange resins for xylitol production. **Process Biochemistry**, v.39, p.1909-1912, 2004.
 - CARVALHO JUNIOR, R.; MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, n.18, p.48-55, 2005.
 - CONSIDINE, D.M. **Chemical and Process Technology Encyclopedia**, New York, McGraw-Hill, 1974.
 - ELLWOOD, K.C.; BHATHENA, S.J.; JOHANNESSEN, J.N.; BRYANT, M.A.; O'DONNELL, M.W. Biomarkers used to assess the effect of dietary xylitol or sorbitol in the rat. **Nutrition Research**, v. 19, n.11, p.1637-1648, 1999.
 - FELIPE, M.G.A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. **Lignocellulose Biodegradation**, American Chemical Society, p.300-315, 2004.
 - MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol - Its Properties and Use as a Sugar Substitute in Foods. **Food R.A. Symp. Sugar And Sugar Replacements**, 1973.
 - MARTON, J.M. Avaliação de diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol. Lorena: FAENQUIL/DEBIQ, 2002. 105p. (Dissertação de Mestrado).
 - MATTILA, P.T., KNUUTTILA, M.L. E., SVANBERG, M.J. Dietary Xylitol Supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, V. 47, p. 578-583, 1998.
 - MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; WELLS, M.L.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, v.17, p.287-293, 2001.
 - PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v.74, p.25-33, 2000.
 - PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in Sugar - Free Confections. **Food Technology**, V.42, n.10, 1988.
 - PROCANA. **Um Mercado de R\$ 36 Bilhões**. Disponível em: <http://www.procana.com.br/conteudo/conheca%20%20setor.asp> Acesso em: 24 de setembro de 2006.
 - PUROLITE. **Cane Syrup**. Documento publicado, 1998.
 - RODRIGUES, R.C.L.B.; SENE, L.; MATOS, G.S.; ROBERTO, I.C.; PESSOA JÚNIOR, A.; FELIPE, M.G.A. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic. **Current Microbiology**, v.53, p.53-59, 2006.
 - RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; VITOLLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, p.299-311, 2001.
 - SILVA, S.S.; MATOS, Z.R.; CARVALHO, W. Effects of sulfuric acid loading and residence time on the composition of sugarcane bagasse hydrolysate and its use as a source of xilose for xylitol bioproduction. **Biotechnology progress**, v.21, p. 1449-1452, 2005.
 - SILVA, T.F.M.; NAZIMA, K.S.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Xylitol production by *Candida guilliermondii* from sugarcane bagasse hydrolysate treated with polymer of vegetable origin. In: VI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages. **Book of Abstracts**, p.153, 2006.
 - SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152-179, 1999.
 - WATSON, N.E.; PRIOR, B.A.; LATEGAN, P.M.; LUSSI, M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6, p.451-456, 1984.
 - ZABNER, J.; SEILER, M.P.; SPACH, J.L.; KARP, P.H.; KEARNEY, W.R.; LOOK, D.C.; SMITH, J.J.; WELSH, M.J. The osmolyte reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.21, p.11614-11619, 2000.