

INFLUÊNCIA DA REATIVAÇÃO QUÍMICA DE CARVÕES ATIVOS NO TRATAMENTO DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA E CRESCIMENTO DE *Candida guilliermondii*

Talita Ferreira Marques da Silva¹, Maria das Graças Almeida Felipe², José Marcelo Marton

1- Rua Dr. José Rodrigues Alves Sobrinho, 886 - Vila Celestina – CEP 12710-410 – Cruzeiro – SP – Brasil - talitamarques@zipmail.com.br

2 - Departamento de Biotecnologia - Faculdade de Engenharia Química de Lorena - Rod. Itajubá-Lorena - Km 74,5 - Caixa Postal 116 - CEP 12600-970 - Lorena - SP - Brasil - mgafelipe@debiq.fauenquil.com.br

Palavras-chave: carvão ativo, reativação química, hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, *Candida guilliermondii*

Área do Conhecimento: III Engenharias

RESUMO

Neste trabalho, foi avaliada a influência da reutilização dos carvões ativos Synth, Carvorite, C117, C118L, C147, CDA e CDG, resultantes da etapa de tratamento do hidrolisado, a partir da reativação química com ácido sulfúrico, na remoção dos compostos tóxicos, consumo de D-xilose e crescimento celular de *Candida guilliermondii*. Verificou-se que a capacidade de adsorção dos carvões diminui com a reativação, porém esta diminuição é relativamente pequena quanto à remoção dos fenóis do hidrolisado, o que sugere ser esta técnica viável.

INTRODUÇÃO

Há anos, o Grupo de Processos Fermentativos (GPF) do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena – DEBIQ/FAENQUIL vem desenvolvendo pesquisas que visam o aproveitamento biotecnológico de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, para a obtenção microbiana de xilitol. Este é um adoçante com propriedades como anticariogenicidade, apropriado para diabéticos (MAKINEN *et al.*, 1976), obesos (YLIKAHRI, 1979) e no tratamento de otites (UHARI *et al.*, 1998), osteoporose (MATILLA *et al.*, 1998) e de fibrose cística (ZABNER *et al.*, 2000). No Brasil, a utilização deste poliálcool se limita à composição de produtos como creme dental, gomas de mascar e pastilhas.

Sua obtenção convencional ocorre a partir da catálise química da D-xilose contida em hidrolisados obtidos de materiais lignocelulósicos ricos em xilana. Este processo químico requerer várias etapas de purificação inicial de D-xilose, uma vez que a presença de impurezas como resíduos de lignina interfere na etapa de redução

catalítica, além da necessidade de purificação final do produto para remoção de resíduos tóxicos do catalisador e subprodutos gerados durante a hidrogenação, o que encarece o produto.

Como alternativa ao processo químico, pesquisas desde 1966 têm sido conduzidas para o desenvolvimento de processos biotecnológicos utilizando microrganismos para a conversão de D-xilose em xilitol sem a necessidade de uso de solução inicial de D-xilose pura (ONISHI e SUZUKI, 1971; SILVA *et al.*, 1996; FELIPE *et al.*, 1997b; SENE *et al.*, 2000). Dentre estes microrganismos, destacam-se as leveduras, principalmente as do gênero *Candida* e em especial a *Candida guilliermondii* pela maior eficiência de bioconversão xilose-xilitol.

Várias pesquisas vem sendo conduzidas visando conhecer os fatores reguladores da bioconversão D-xilose em xilitol principalmente a partir de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Dentre estes fatores destaca-se a presença de compostos tóxicos nos hidrolisados como ácido acético, fenóis, furfural e hidroximetilfurfural (FELIPE *et al.*, 1997a, ALVES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2001) os quais

inibem essa bioconversão, em função da concentração em que estes se encontram no meio.

Assim, para a utilização hidrolisados hemicelulósicos neste bioprocessos, vários tipos de tratamentos vêm sendo empregados com o objetivo de reduzir as concentrações dos compostos tóxicos nos hidrolisados e melhorar suas fermentabilidades. Estes tratamentos podem ser classificados em função da forma (individual ou combinado) e natureza dos agentes empregados (biológico, físico e químico). Entre estes, a alteração de pH combinada com adsorção em carvão ativo vem sendo um dos procedimentos utilizados para detoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos para bioconversão de D-xilose em xilitol (ALVES *et al.*, 1998; MARTON, 2001). Durante este tratamento o carvão é descartado o que pode vir a causar um impacto ambiental negativo ao se considerar processos em escala industrial o que impulsiona as pesquisas quanto à avaliação da reutilização deste após o tratamento.

OBJETIVO

Avaliar a influência da reativação química de carvões ativos no tratamento de hidrolisado de bagaço de cana e crescimento de *Candida guilliermondii*.

METODOLOGIA

Hidrólise Ácida do Bagaço de Cana

A hidrólise foi realizada conforme metodologia estabelecida por RODRIGUES *et al.*, (2001).

Concentração e Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana

A concentração foi realizada em um evaporador rotativo, com aquecimento por fluido térmico em banho termostático controlado em aproximadamente 70°C, com a finalidade de aumentar o teor inicial de D-xilose e reduzir o teor de compostos tóxicos voláteis.

O tratamento foi realizado empregando-se alteração de pH combinada com adsorção em carvão ativo. A alteração de pH foi definida pela elevação do pH inicial para 7,0 com adição de CaO, seguida da redução para pH 5,5 com adição de H₃PO₄, sob agitação magnética. Em seguida foi adicionado H₂SO₄ ao hidrolisado até pH 1,0 e posteriormente, carvão ativo (das marcas Synth, Carvorite, C117, C118L, C147, CDA e CDG), na

proporção 10% (p/v). A adsorção em carvão ativo ocorreu na temperatura de 30°C, com o tempo de contato igual a 60 minutos e agitação de 100 rpm. Após a retirada do carvão, o pH foi elevado para 5,5, com NaOH (lentilhas). Por último, o hidrolisado foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e centrifugado, em frasco previamente estéril, a 3000 rpm por 20 minutos. A cada alteração de pH o hidrolisado foi filtrado a vácuo (MARTON, 2001).

Reativação Química dos Carvões

Primeiramente os diferentes resíduos de carvões foram secos em estufa à 80°C. Em seguida, estes carvões foram submetidos à reativação com H₂SO₄ concentrado. Uma parte do carvão foi misturada com 1,8 partes de ácido (em massa), seguido do aquecimento a 80°C ± 5°C por 12 horas. Logo após, o material foi lavado com água destilada para a remoção do ácido livre, e então embebido com solução de bicarbonato de sódio 1% por 24 horas à temperatura ambiente, para remover o ácido residual. Novamente foi lavado com água destilada e seco a 80°C (NAMASIVAYAM & KADIRVELU, 1997).

Microrganismo e Preparo do Inóculo

O inóculo foi obtido a partir de uma alçada da cultura estoque de *Candida guilliermondii* recém repicada, para frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio semi-definido composto de D-xilose (30 g/L), sulfato de amônio (2 g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1 g/L) e extrato de farelo de arroz (20 g/L), em incubadora de movimento rotatório sob agitação de 200 rpm, a 30°C por 24 horas.

A concentração inicial de células no processo fermentativo foi de 1,0 g/L (de 1,2 - 4,0 x 10⁷ células/mL).

Meios e Condições de Fermentação

O hidrolisado concentrado e tratado (D-xilose: 50,51 g/L, L-arabinose: 7,00 g/L, D-glicose: 3,17 g/L, ácido acético: 3,23 g/L, fenóis: 22,15 g/L, furfural: 0,030 g/L e hidroximetilfurfural 0,022 g/L) foi esterilizado a 121°C por 20 minutos e suplementado com os mesmos nutrientes empregados no preparo do inóculo.

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio, sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório a 30°C, por 48 horas.

Métodos Analíticos

Os açúcares (D-xilose, L-arabinose, D-glicose), ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por HPLC e os fenóis pelo método do $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$ (RODRIGUES *et al.*, 2001).

A concentração celular foi realizada por contagem de células em câmara de Neubauer ($1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência do Tratamento do Hidrolisado com Diferentes Carvões Ativos na Remoção de Compostos Tóxicos

Pela Tabela 1, pode-se verificar que depois de reativado a maioria dos carvões perdeu parte de sua eficiência quanto à remoção de ácido acético e fenóis, presentes no hidrolisado. Os demais compostos tóxicos não foram detectados depois do tratamento.

Com relação à remoção do ácido, não se obteve bons resultados com as reativações dos carvões, pois em média reduziram à metade seu poder de retenção, porém segundo FELIPE *et al.*, (1995), a toxicidade deste ácido à levedura ocorre em concentração superiores a 3,0 g/L. Estes autores encontraram que baixas concentrações deste ácido favorecem a bioconversão de D-xilose em xilitol durante o cultivo desta levedura em meio sintético.

Já para os fenóis, pode-se dizer que os resultados obtidos foram muitos satisfatórios, pois quando o hidrolisado foi tratado com carvões sem reativar obteve-se remoções que variaram de 93,10% até 80,25%, enquanto obteve-se valores que variaram de 90,83% até 70,29% e de 72,15% até 54,80%, quando os carvões foram reativados uma e duas vezes, respectivamente.

Tabela 1 - Remoção (%) de compostos tóxicos em função dos diferentes carvões ativos não reativados (A), reativados uma (B) e duas vezes (C) com H_2SO_4 empregados no tratamento do hidrolisado.

CARVÕES	% REMOÇÃO					
	Ácido Acético			Fenóis		
	A	B	C	A	B	C
Synth	62,04	17,31	28,78	80,25	70,29	54,80
Carvorite	78,78	42,78	18,05	81,81	76,71	66,46
C117	75,10	21,82	38,86	91,06	90,83	69,49
C118L	68,72	22,10	27,82	83,81	76,87	72,15
C147	58,21	28,19	40,56	82,50	77,95	63,99
CDA	68,78	35,80	32,40	93,10	77,29	67,06
CDG	69,92	36,91	30,05	89,01	76,52	68,64

Para melhor visualização e comparação dos resultados obtidos referentes à remoção dos inibidores ácido acético e fenóis, foram feitos gráficos que se encontram na Figura 1.

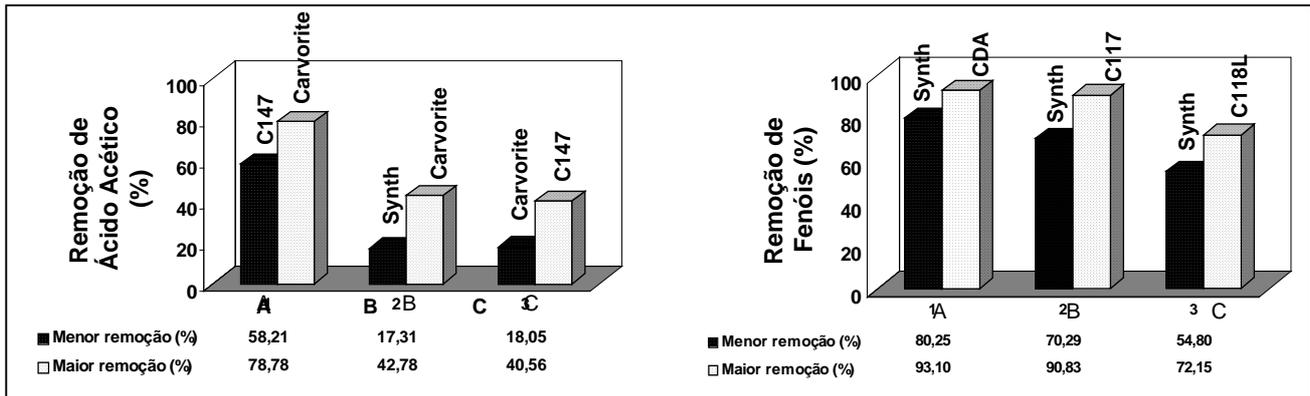


Figura 1 - Valores mínimos e máximos de remoção (%) de compostos tóxicos em função do tratamento do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com diferentes carvões ativos, não reativados (A), reativados uma (B) e duas vezes (C) com H_2SO_4 .

Fermentação dos Hidrolisados

Em vista dos resultados obtidos com relação à porcentagem de consumo de D-xilose (Figura 2), observa-se que os máximos e os mínimos valores obtidos foram 95,01% para o C117 e 84,83% para o CDA não reativados, 83,16% (C118L) e 75,65% (C117) para os carvões reativados uma vez com H_2SO_4 e 68,37% (C118L) e 53,90% (Synth), para os carvões reativados duas vezes com H_2SO_4 .

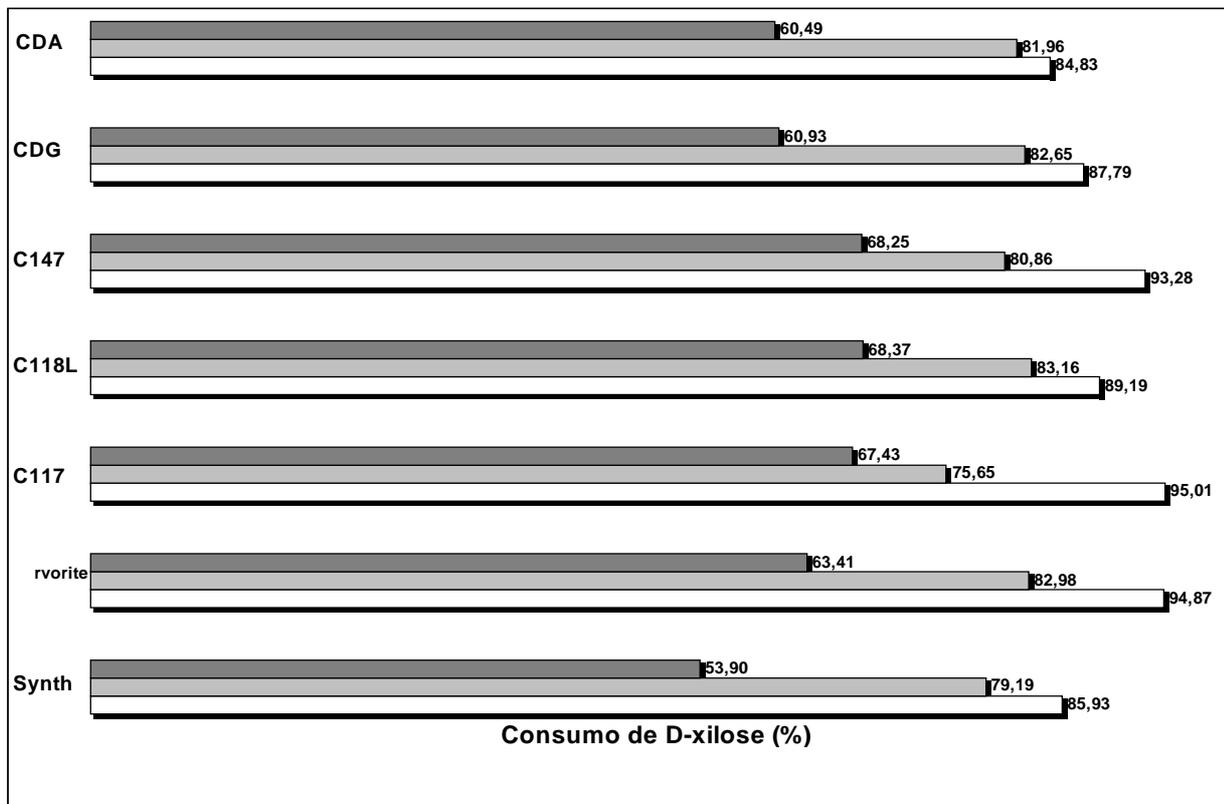
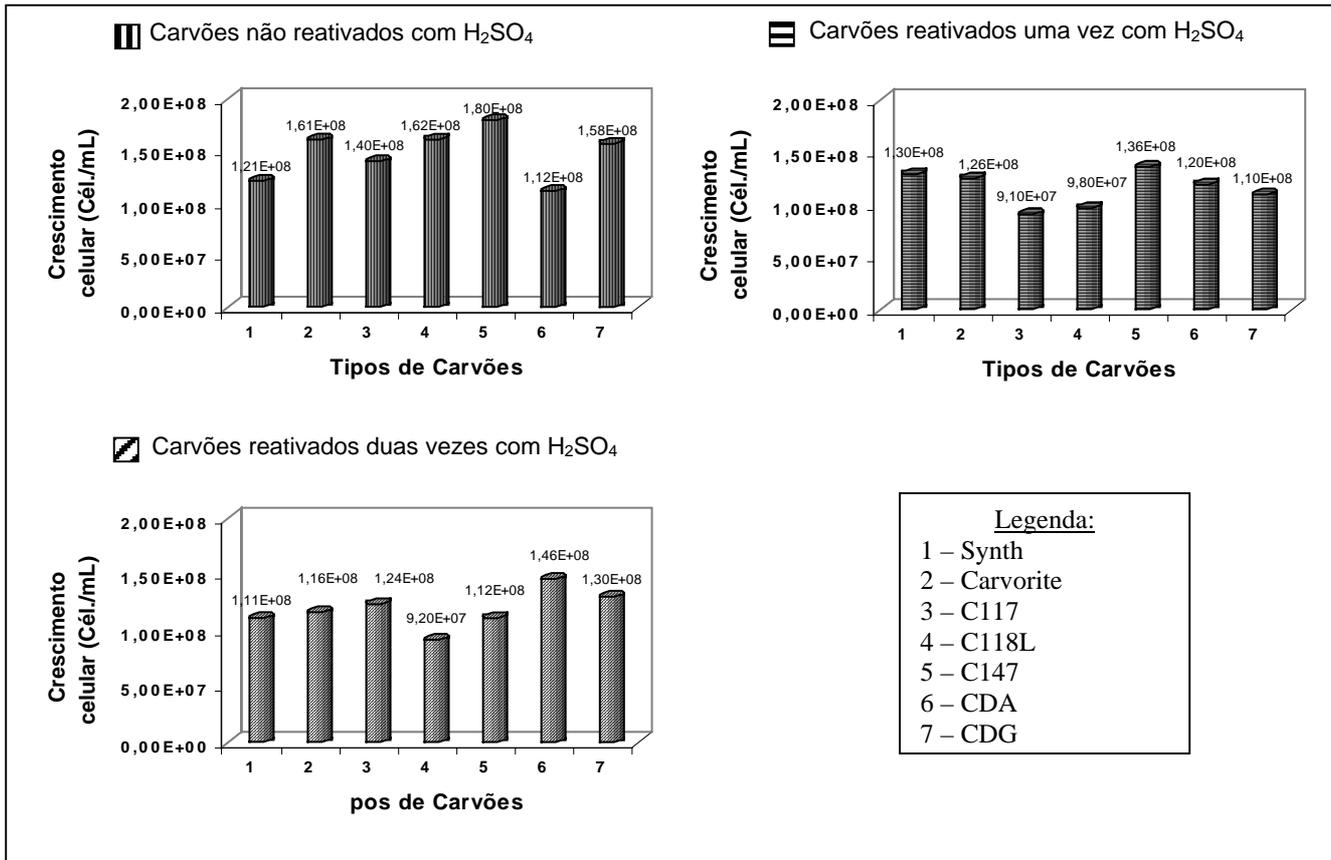


Figura 2 - Consumo de D-xilose (%) após 48 horas de cultivo de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar tratado com diferentes tipos de carvões não reativados, reativados uma e duas vezes com H_2SO_4 .

Para o crescimento celular (Figura 3), também há evidências de que a reativação dos carvões influenciou na formação de células, pois houve um decréscimo do crescimento quando o hidrolisado foi tratado com carvões reativados, o que ocorreu possivelmente pelo menor consumo de D-xilose. Embora a reativação dos carvões tenha possibilitado a redução da concentração

dos fenóis durante o tratamento do hidrolisado, provavelmente a baixa concentração deste, interferiu no metabolismo da levedura em função do efeito sinérgico exercido entre os fenóis e outros compostos tóxicos presentes no meio mesmo que em baixas concentrações consideradas não inibitórias ao metabolismo.



não reativados, reativados uma e duas vezes.

CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitem concluir que o emprego de diferentes marcas de carvões ativos reativados ou não, tem influência sobre a remoção dos compostos tóxicos, crescimento celular e consumo de D-xilose. Verificou-se que é possível a reativação química dos carvões sem grandes perdas da capacidade de adsorção, principalmente quanto à remoção de fenóis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; SILVA S. S.; PRATA A. M. R. Pre treatment

of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida guilliermondii*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 70-72, p.89-98, 1998.

FELIPE, M. G. A., VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental Parameters Affecting Xylitol Production from Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology, v.18, p.251-254, 1997a.

FELIPE, M. G. A., VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Fermentation of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate for Xylitol Production: Effect of pH, Biomass and Bioenergy, v. 13, n 1-2, p. 11-14, 1997b.

- FELIPE, M. G. A., VEIRA, M. V.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, C.I.; SILVA, S. S. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. J. Basic Microbiol, v. 35, n.3, p. 171-177, 1995.
- MAKINEN, K. K. Xylitol: The Sugar that Prevents Tooth Decay. The Futurist, Washington, June, p. 135-139, 1976.
- MARTON, J.M. Avaliação de Diferentes Carvões Ativos e das Condições de Adsorção no Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana para Obtenção Biotecnológica de Xilitol. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia. Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Lorena, 2001.
- MATTILA, P. T., KNUUTTILA, M. L. E., SVANBERG, M. J. Dietary Xylitol Supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin -diabetic rats. Metabolism, 47: 578-583, 1998.
- NAMASIVAYAM, C., KADIRVELU, K. Activated Carbons Prepared From Coir Pith By Physical and Chemical Activations Methods. Bioresource Technology, 62, p. 123-127, 1997.
- ONISHI, H. ; SUZUKI, T. Process for Producing Xylitol by Fermentation. US 3.619.369, 08 jul. 1969. 09 nov. 1971.
- RODRIGUES, R.C.L.B., FELIPE, M.G.A., ALMEIDA E SILVA, J.B., VITOLO, M.GÓMEZ, P.V.F. 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.
- SENE, L.; VITOLO, M.; FELIPE M.G.A.; SILVA, S. S. Effect of Environmental Conditions on Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Production by *Candida guilliermondii*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 84-86, p.371-380, 2000.
- SILVA, S. S.; VITOLO, M.; PESSOA JUNIOR, A.; FELIPE, M. G. A. Xylose Reductase and Xylitol Desidrogenase Activities by Xylose Fermenting *Candida guilliermondii*. Journal Basic Microbiology, v. 36, n.3, 1996.
- UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; NIEMELA M. a novel Use of Xylitol Sugar in Preventin Acute Otitis Media. Pediatrics, v.102, n.4, p.879-884, 1998.
- YLIKAHRI, R. Metabolic and Nutritional Aspects of Xylitol. Advances in Food research, New York, v. 25, p. 159- 180, 1979.
- ZABNER, J., MICHAEL, P.S., LAUNSPACH, J.L., KARP, P.H., KEARNEY, W.R. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. PNAS, v. 97, n.21, p.1164-11619, 2000.

AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro: FAPESP E CNPq