

ANÁLISE DO VOLATOMA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE NECTÁRIOS FLORAIS E INSETOS POLINIZADORES A PARTIR DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS

STÉFANY KEEL BRESSAN ^{1,2,*}, MARIANA DINIZ ^{1,2}, LARISSA WERLANG ^{1,2},
ANDERSON GIEHL ^{2,3}, SÉRGIO LUIZ ALVES JR ^{1,2,3,**}

1 Introdução

A geração de resíduos agroindustriais cresce constantemente à medida que a população e a produção de alimentos aumentam. Portanto, é necessário o desenvolvimento de alternativas para um melhor aproveitamento desses resíduos, como a geração de bioprodutos por leveduras em biorrefinarias de segunda geração. Entretanto, leveduras industriais como a *Saccharomyces cerevisiae* não demonstram eficiência na fermentação de pentoses, como a xilose, advinda da matéria lignocelulósica. Sendo assim, é desejável a busca por novas leveduras capazes de suprir tal função. Nesse contexto, as leveduras selvagens isoladas de flores e até mesmo insetos se destacam como alternativa quando se trata de fermentação de hexoses, pentoses e dissacarídeos, uma vez que podem tolerar substâncias inibitórias oriundas das etapas de pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos (NDUBUISI *et al.*, 2023).

A relação ecológica que se estabelece entre insetos e plantas tem sido relatada há séculos, porém somente recentemente se notou que os referidos invertebrados são atraídos por sinais químicos liberados por microrganismos, como leveduras, que habitam as flores. Leveduras têm grande representatividade em nectários florais, devido à abundância de açúcares como frutose, glicose e sacarose, que servem de fonte de carbono para o crescimento microbiano. Contudo, em estações sem floração essas leveduras precisam encontrar locais para se manterem vivas. Como alguns desses microrganismos são capazes de metabolizar carboidratos como glicose, frutose e xilose (que podem ser obtidos a partir da hidrólise de resíduos vegetais), buscam como alternativa o ambiente gastrointestinal de insetos. Ademais,

¹ Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, *Campus* Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó/SC.

² Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos (GPPEM), *Campus* Chapecó, UFFS, Chapecó/SC.

³ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

* Bolsista de Iniciação Científica, e-mail: stefanybressan123@gmail.com

** Orientador, e-mail: slalvesjr@uffs.edu.br

devido ao seu metabolismo, essas leveduras também são capazes de produzir compostos de grande importância biotecnológica, como compostos orgânicos voláteis (VOCs), ácidos graxos e até mesmo vitaminas (FENNER *et al.* 2022; GUO *et al.* 2023).

2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo isolar leveduras de flores e insetos e avaliar seu potencial biotecnológico na produção de compostos com diferentes aplicações industriais (VOCs, ácidos graxos e vitaminas).

3 Metodologia

As linhagens de levedura denominadas CHAP-208c e CHAP-222 foram isoladas de flores de Fedegoso (*Senna macranthera*). Para isso, foi feita uma raspagem do néctar floral com swab estéril, seguido de esgotamento em meio sólido YNB (6,7 g/L de base nitrogenada de leveduras) com 10 g/L de xilose, 0,2 g/L de cloranfenicol e 20 g/L de ágar. As linhagens CHAP-237 e CHAP-248 foram isoladas, respectivamente, de besouros da espécie *Astylylus variegatus* e de abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* (popularmente conhecida como Mandaguari). Para isso, os insetos foram coletados e inoculados em meio líquido YNB contendo também 10 g/L de xilose e 0,2 g/L de cloranfenicol. Após 3–5 dias de cultivo a 30 °C, alçadas de 10 µL foram retiradas do meio e estriadas por esgotamento em meios sólidos com a mesma composição (acrescidos de 20 g/L de ágar). As culturas puras foram obtidas a partir da seleção de colônias isoladas com morfologia típica de levedura.

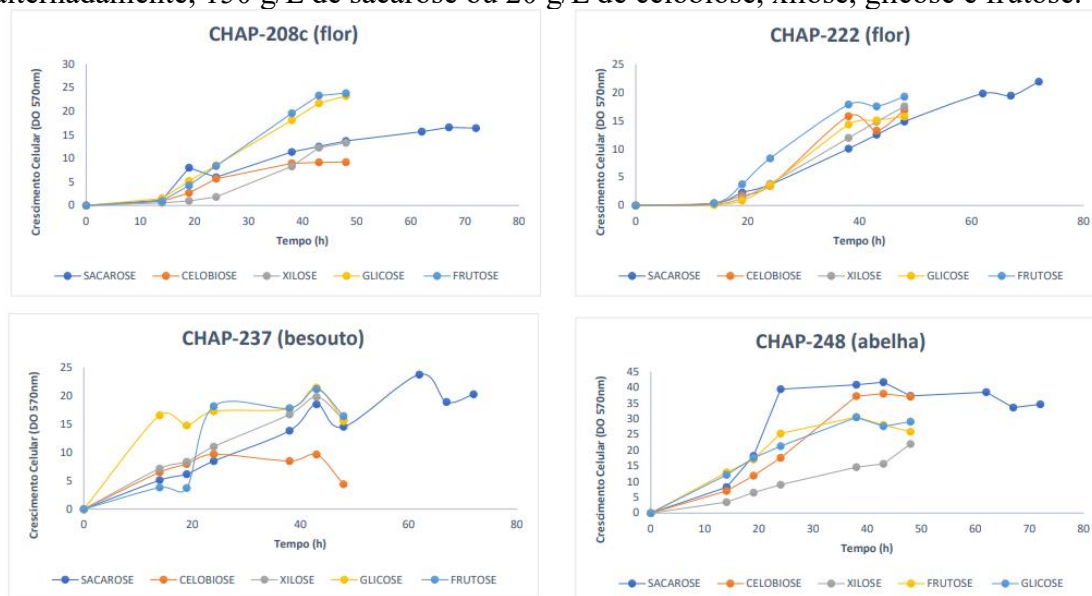
As quatro linhagens tiveram seu crescimento celular avaliado em meios YP (10 g/L de extrato de leveduras e 20 g/L de peptona, pH 5,0) contendo, alternadamente, 20 g/L de xilose, frutose, glicose e celobiose ou 150 g/L de sacarose. Visto que, são todos carboidratos altamente encontrados em resíduos lignocelulósicos. Os cultivos foram realizados sob agitação de 145 rpm a 30 °C por 48 h em todas as condições, exceto para os meios com sacarose, que permaneceram incubados por 72 h (haja vista a maior disponibilidade de açúcar). Para o acompanhamento do crescimento celular, amostras do meio foram coletadas três vezes ao dia (7:30h, 12:30h e 17:30h) e suas absorvâncias foram analisadas em um espectrofotômetro (DO 570 nm). Ao fim dos cultivos, todos os meios foram transferidos para tubos Falcon que passaram por uma centrifugação a 8500 g por 5 min e tiveram seus sobrenadantes reservados. Com o auxílio de um funil de separação, 20 mL de cada sobrenadante foram misturados a 6,67 mL de diclorometano para extração líquido-líquido, seguindo uma adaptação de ROQUE *et al.*

(2019). Na sequência, a fase apolar contendo diclorometano foi enviada para um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), a fim de identificar tanto VOCs quanto outros compostos provenientes do metabolismo das leveduras avaliadas. A biblioteca utilizada para a espectrometria foi a NIST08s. Como controle negativo, meios de cultura prévios ao inóculo também passaram pelo mesmo processo de extração e análise cromatográfica.

4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos através das curvas de crescimento das quatro linhagens avaliadas demonstram que todas elas foram capazes de crescer consumindo os carboidratos testados (sacarose, celobiose, xilose, glicose e frutose) (Figura 1). Entretanto, além de cada linhagem apresentar uma variação no ritmo de crescimento, uma vez que são obtidas de diferentes ambientes, é possível observar que as linhagens advindas de insetos apresentaram um crescimento inicial maior, com especial destaque para a CHAP-248, cujo crescimento foi até duas vezes superior ao apresentado pelas demais.

Figura 1 – Curva de crescimento das quatro linhagens testadas em meios contendo, alternadamente, 150 g/L de sacarose ou 20 g/L de celobiose, xilose, glicose e frutose.



Os compostos obtidos por meio da extração líquido-líquido ao fim dos cultivos estão elencados no Quadro 1. A abundância relativa dos compostos nas amostras é dada pela sua área em porcentagem. Foram considerados resultados com índice de confiança ≥ 70 .

Quadro 1 – Compostos obtidos durante o cultivo das linhagens testadas em meios de cultura contendo, alternadamente, frutose, xilose, sacarose, glicose ou celobiose.

Linhagem	Composto detectado	Área (%)*	Linhagem	Composto detectado	Área (%)*
<i>Meios com Frutose</i>			<i>Meios com Xilose</i>		
CHAP-208c	1-trideceno	1,74	CHAP-208c	5,10-Dietoxi-2,3,7,8-tetra-hidro-1H,6H-dipirrolol[1,2-a:1',2'-d]pirazina	15,47
CHAP-222	2-fenil-etanol	33,94	CHAP-222	2-fenil-etanol	33,51
	1-Dodecanol	0,73	CHAP-222	5,10-Dietoxi-2,3,7,8-tetra-hidro-1H,6H-dipirrolol[1,2-a:1',2'-d]pirazina	5,80
CHAP-237	2-fenil-etanol	5,73	CHAP-237	2-fenil-etanol	1,56
	Ácido Palmítico	4,71	CHAP-237	1,19-ecoisadieno	1,96
	Ácido Esteárico	28,2	CHAP-237	5,10-Dietoxi-2,3,7,8-tetra-hidro-1H,6H-dipirrolol[1,2-a:1',2'-d]pirazina	7,54
CHAP-248	3-Etil-3-metilpentano	1,54	CHAP-248	Ácido Ascórbico	16,88
	2-fenil-etanol	8,03	CHAP-248	Ácido Oleico	13,66
	Ácido Palmítico	1,33	CHAP-248	3,6-Diisobutil-2,5-piperazinediona	8,28
<i>Meios com sacarose</i>			CHAP-248	Ácido Esteárico	12,08
CHAP-208	2-fenil-etanol	1,49	CHAP-248	Prolina	1,90
CHAP-222	2-fenil-etanol	44,89	<i>Meios com glicose</i>		
	Ácido butanodioico	1,06	CHAP-208c	Ácido hexanoico	12,44
CHAP-237	3-Etil-3-metilpentano	1,49	CHAP-208c	Ácido eláidico	3,61
	2-fenil-etanol	1,55	CHAP-208c	3,6-Diisobutil-2,5-piperazinediona	2,55
	Ácido Palmítico	10,25	CHAP-208c	Ácido Esteárico	1,79
Chap 248	Methionol	3,07	CHAP-222	2-fenil-etanol	30,09
	Metil-4-O-metilpentopiranosídeo	1,24	CHAP-222	2-fenil-etanol	6,34
	2-fenil-etanol	43,99	CHAP-222	Ácido Ascórbico	13,41
<i>Meios com celobiose</i>			CHAP-237	Ácido Oleico	6,91
CHAP-208c	Heptadecano	3,98	CHAP-237	3,6-Diisobutil-2,5-piperazinediona	2,16
CHAP-222	Leucina	1,97	CHAP-237	Ácido Esteárico	5,59
CHAP-237	13-decosenamida	7,76	CHAP-248	2-fenil-etanol	16,81
CHAP-248	2-fenil-etanol	7,82	CHAP-248	L-Prolamida	15,97

*Área relativa do pico em cromatografia gasosa considerando o total de compostos encontrados.

No Quadro 1, é possível notar a produção de VOCs, principalmente 2-fenil-etanol. Essa substância é usada para cuidados domésticos e pessoais e como agente aromatizante e pesticida (FENNER *et al.*, 2022). Destaca-se também a presença de ácidos graxos como o ácido palmítico (éster etílico 2-hidroxi-1-(hidroximetil) hexadecanóico), ácido oleico e ácido esteárico (Ácido Octadecanóico), utilizados principalmente em indústrias oleoquímicas e na fabricação de produtos biodegradáveis como biolubrificante e bioplásticos. O ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato (Vitamina C) também pôde ser encontrado na fermentação conduzida pela CHAP-248 em meio com xilose. A presença dessa vitamina aumenta a resistência da levedura ao estresse, gerando maior tolerância a pH baixos e ao efeito de ácidos orgânicos nessas condições (BRANDUARDI *et al.*, 2007). Ademais, aminoácidos e derivados também foram produzidos por algumas das leveduras testadas (Quadro 1).

5 Conclusão

Os resultados obtidos indicam que leveduras isoladas de plantas e insetos apresentam potencial biotecnológico, contribuindo para o desenvolvimento de novas alternativas para biorrefinarias. Os microrganismos analisados demonstraram potencial na produção de VOCs e ácidos graxos, substâncias de alto valor agregado. A linhagem CHAP-248 se destacou entre as leveduras testadas, apresentando um crescimento exponencial acelerado, que reflete um consumo rápido dos carboidratos presentes nos meios. Assim sendo, trabalhos futuros visam testar tais linhagens de forma direta em hidrolisados lignocelulósicos.

Referências Bibliográficas

- BAHADI, M. et al. Optimization of Response Surface Methodology by D-Optimal Design for Alkaline Hydrolysis of Crude Palm Kernel Oil. **Sains Malaysiana**, v. 49, p. 29-41, 2020. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2020-4901-04>.
- BRANDUARDI, P. et al. Biosynthesis of Vitamin C by Yeast Leads to Increased Stress Resistance. **Plos One**, v. 2, artigo. 1092, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001092>.
- FENNER, E. D. et al. Nature's Most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms. **Journal of Fungi**, v. 8, artigo 984, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8100984>.
- GUO, H. et al. Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review. **Bioresource Technology**, v. 367, artigo 128252, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128252>.
- NDUBUISI, I. A. et al. Non-conventional yeast strains: unexploited resources for effective commercialization of second generation bioethanol. **Biotechnology Advances**, v. 63, artigo 108100, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108100>.
- ROQUE, L. R. et al. Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, v. 242, p. 775-787, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.12.130>.

Palavras-chave: Abelha, Ácido Graxo, Besouro, Flor, Sacarose, VOCs.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2022-0224

Financiamento: UFFS