

## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

### **Produção de biossurfactantes utilizando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar e avaliação do efeito larvicida em *Aedes aegypti***

**Paulo R. F. Marcelino<sup>1</sup>, Liz Blascovich<sup>1</sup>, Guilherme F. D. Perez<sup>1</sup>, Sabrina E. Martiniano<sup>1</sup>, Rafael R. Philippini<sup>1</sup> e Silvio S. da Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena – Departamento de Biotecnologia  
CEP 12.602-810 – Lorena – São Paulo - E-mail: paulorfm1@hotmail.com

#### **RESUMO**

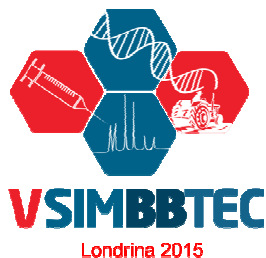
*Biossurfactantes são compostos versáteis produzidos por microrganismos com propriedades tensoativas, emulsificantes, antimicrobianas e antitumorais, que apresentam uma vasta aplicação, abrangendo as indústrias química, farmacêutica, alimentícia, petrolífera e até mesmo a agricultura. Além disso, são conhecidos por serem produtos ecologicamente corretos, devido a elevada biodegradabilidade e baixa ou nula toxicidade, não representando riscos ao meio ambiente e ao homem. Porém, nos últimos anos os biossurfactantes vêm se destacando por serem alternativas de produtos as biorrefinarias lignocelulósicas e atuarem no combate de vetores de doenças tropicais negligenciadas, como o *Aedes aegypti*, transmissor de dengue e as febres Chikungunya e Zika. No presente trabalho foram produzidos biossurfactantes em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras e avaliado o efeito larvicida desses compostos contra *A. aegypti*, que se mostrou eficiente, eliminando entre 10 – 100 % das larvas.*

**Palavras-chave:** Biossurfactantes, Hidrolisado Hemicelulósico, Leveduras, *Aedes aegypti*

#### **INTRODUÇÃO**

Biossurfactantes são compostos de origem microbiana, com estruturas variadas, que apresentam propriedades tensoativa, emulsificante, antimicrobiana e antitumoral. Devido as suas propriedades, os biossurfactantes são extensamente utilizados nas indústrias química, alimentícia, farmacêutica e na agricultura (FONTES et al., 2008; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Outro fato que vem se destacando recentemente é o uso dos biossurfactantes no controle biológico de larvas do *Aedes aegypti*, mosquito vetor de doenças tropicais negligenciadas como a dengue, que somente em 2014 registrou aproximadamente 584 mil casos no país, e as febres *Chikungunya* e *Zika*, novas doenças que já vêm fazendo vítimas no país (IBGE, 2015; FIOCRUZ, 2015). Além das inúmeras aplicações, os biossurfactantes são considerados substâncias ecologicamente corretas, uma vez que são produzidos por processos sustentáveis e apresentam elevada biodegradabilidade e baixa toxicidade. Quando comparados aos surfactantes sintéticos, têm como vantagens a elevada tolerância ao pH, temperatura e força iônica extremas (FONTES et al., 2008; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Apesar da versatilidade e das vantagens dos biossurfactantes, a produção desses compostos ainda é um fator preocupante, já que os custos do processo são elevados, refletindo no preço final dos produtos. De acordo com Cameotra e Makkar (1998), as matérias-primas representam



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

### 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

até 30 % dos custos de um bioprocesso. Uma forma de solucionar esse problema é a utilização de subprodutos/resíduos industriais como matérias-primas na produção. No caso dos biossurfactantes, são comumente empregados como matérias-primas a glicerina resultante da indústria de biodiesel e óleos residuais das indústrias alimentícias. Porém, com o recente avanço das pesquisas voltadas para a concretização das biorrefinarias lignocelulósicas, o bagaço de cana-de-açúcar, subproduto do setor sucroalcooleiro, é uma das alternativas para a produção dos biossurfactantes.

O presente trabalho tem como principal objetivo a utilização do hidrolisado hemicelulósico para a síntese de biossurfactantes por leveduras capazes de assimilar e fermentar D-xilose como fonte de carbono e a aplicação desses compostos no controle biológico de larvas do mosquito *A. aegypti*.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Microrganismos e meios de manutenção:** nos testes foram utilizadas as leveduras *Candida shehatae* (SSS 1), *Issatchenkia occidentalis* (SSS 5), *Issatchenkia orientalis* (SSS 6), *Candida shehatae* (SSS 13), *Scheffersomyces stipitis* (SSS 18), *Candida shehatae* (SSS 28) e *Scheffersomyces stipitis* (SSS 29). As leveduras foram mantidas em placas de Petri com meio YMA e refrigeradas a 4 °C.

**Preparo do inóculo e fermentações:** para o preparo do pré-inóculo as leveduras foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio de cultivo proposto por Kitamoto (1990) suplementado com 40 g/L de xilose. Os cultivos foram realizados em shaker à 200 rpm, 30 °C e interrompidos após 48 horas. As células foram então separadas por centrifugação à 4000 rpm por 15 minutos, ressuspensas em solução salina 0,9 % (m/V) e a absorvância à 600 nm ajustada para aproximadamente 1. Por fim, as células foram inoculadas em meio de cultivo proposto por Kitamoto suplementado com hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar destoxificado e as fermentações foram realizadas nas mesmas condições utilizadas no pré-inóculo, porém, com uma duração de 68 horas. Posteriormente, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação à 4000 rpm por 15 minutos.

**Isolamento dos biossurfactantes:** os sobrenadantes foram então acidificados até pH 2,0 e mantidos à 4 °C "overnight". Posteriormente, foram extraídos 3 vezes, com acetato de etila. O solvente foi então evaporado e os extratos ressuspensos em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0.

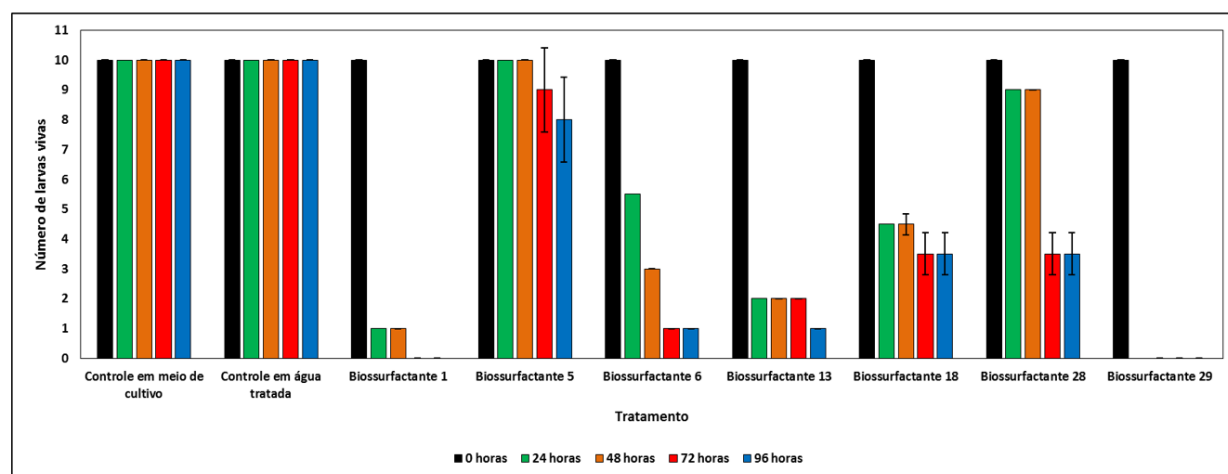
**Análise da anti-larvícia dos biossurfactantes em *A. aegypti*:** os biossurfactantes isolados foram quantificados utilizando a metodologia de Fenol-Ácido Sulfúrico (DUBOIS, 1956). Posteriormente, foram diluídos até uma concentração de 1000 mg/L em água mineral. Cerca de 20 mL dessas soluções e 10 larvas de *A. aegypti* em diferentes estágios de desenvolvimento foram transferidos para frascos plásticos de 50 mL. Nas tampas foram feitos pequenos orifícios para permitir a troca gasosa e os recipientes mantidos na ausência de luz. Os ensaios foram realizados em triplicata e como controles foram utilizados a água mineral e o meio de cultivo não-inoculado (SILVA et al., 2014).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho observa-se que os biossurfactantes podem ser considerados produtos alternativos para as biorrefinarias lignocelulósicas, uma vez que leveduras de três diferentes

gêneros produziram essas substâncias utilizando o hidrolisado hemicelulósico como única fonte de carbono. Os biossurfactantes produzidos por leveduras são comumente classificados em glicolipídeos, complexos carboidrato-proteína-lipídeo e carboidrato-proteína, devido a isso, uma forma de fácil quantificação desses produtos se dá pelo método de quantificação de açúcares totais. As produtividades foram baixas, variando entre 0,005017 e 0,132854 g/L.h. Porém, deve-se salientar que no presente estudo os compostos não tiveram suas produções otimizadas.

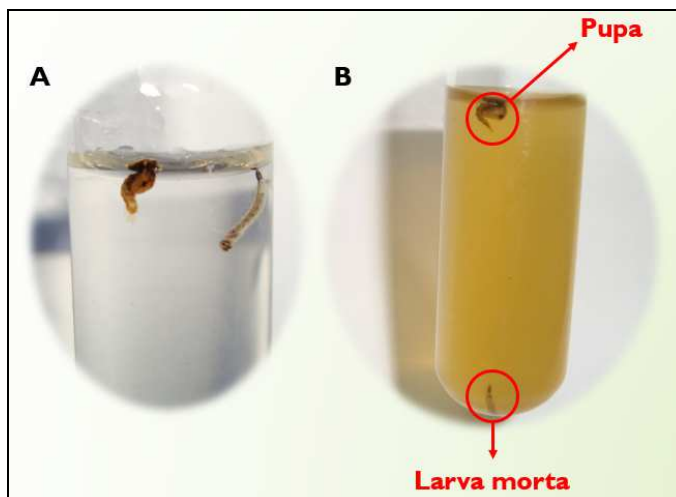
Como pode ser observado na Figura 1, o tratamento de larvas de *A. aegypti* com os biossurfactantes numa concentração de 1000 mg/L mostrou-se eficiente, uma vez que eliminou entre 20 – 100 % das larvas em até 96 horas de ensaios.



**Figura 1:** Número de larvas de *A. aegypti* vivas em até 96 horas de exposição aos biossurfactantes. A notação Biossurfactante 1, 5, 6, 13, 18, 28 e 29 refere-se aos compostos produzidos respectivamente pelas leveduras *Candida shehatae* (SSS 1), *Issatchenkia occidentalis* (SSS 5), *Issatchenkia orientalis* (SSS 6), *Candida shehatae* (SSS 13), *Scheffersomyces stipitis* (SSS 18), *Candida shehatae* (SSS 28) e *Scheffersomyces stipitis* (SSS 29).

A ação larvicida e mosquitocida dos biossurfactantes em *A. aegypti* vem sendo recentemente relatada por vários autores, como Geetha et al. (2012) e Silva et al. (2014). De acordo com Christophers (1960), a interação dos biossurfactantes com o sifão respiratório, região altamente hidrofóbica com umidade controlada, permite uma exposição maior ao meio aquoso, e assim, a água flui pela cavidade espiracular das larvas. Além disso, as bolsas de ar traqueais, que apresentam uma gravidade específica muito próxima da água, facilitando a subida até a superfície para respiração, são influenciadas pela presença das substâncias surfactantes, alterando e dificultando a hidrostática da larva, levando a um exacerbado gasto energético e morte por afogamento (Figura 2).

Estudos que elucidem a ação dos biossurfactantes nas cutículas das larvas e mosquitos de *A. aegypti* também devem ser desenvolvidos. Recentemente, foram identificados ácidos carboxílicos, aldeídos e hidrocarbonetos presentes nas cutículas de mosquitos *A. aegypti* (PAIXÃO, 2011). Como se sabe, biossurfactantes são capazes de emulsificar compostos apolares, que acabariam removendo esses compostos do exoesqueleto e desestruturando-o.



**Figura 2:** Ação dos biossurfactantes produzidos por leveduras em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar em larvas e pupas de *Aedes aegypti*. (A) Experimento sem a aplicação do biossurfactante e (B) Experimento com a aplicação do biossurfactante.

### CONCLUSÕES

Os biossurfactantes do presente trabalho foram produzidos por leveduras a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, podendo ser considerados como possíveis produtos de alto valor agregado para as biorrefinarias lignocelulósicas. Além disso, apresentaram-se eficazes no combate de larvas de *A. aegypti* eliminando entre 10 – 100 % das larvas em testes *in vitro*.

**Agências de Fomento:** Capes, CNPq e FAPESP.

### REFERÊNCIAS

- CAMEOTRA, S. S. e MAKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl. Microb. and Biotech.**, v. 50, n. 5, p. 520–529, 1998.
- CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.), The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics, and Structure. New York: Cambridge University Press, 1960.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.** Vol: 28(3):350-356. 1956.
- FONTES, Gizele Cardoso; AMARAL, Priscilla Filomena Fonseca; COELHO, Maria Alice Zarur. Produção de biossurfactante por levedura. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.
- GEETHA, I.; KUMMANKOTTIL, P.P.; MANONMANI, A.M. Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* subsp *subtilis*. **Pest. Manag. Sci.** 2012; 68: 1447–1450. 2012.
- NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 772-776, Sept. 2002.
- SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R. B.; VON ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J. Larvicidal activity of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 against *Aedes aegypti* larvae. In: SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2014, St. Louis.
- [www.ibge.org.br](http://www.ibge.org.br) (Acessado em Maio/2015).
- [www.portalfiocruz.br](http://www.portalfiocruz.br) (Acessado em Maio/2015).