

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**GRAZIELA DE OLIVEIRA TEIXEIRA BALIEIRO**

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR  
*Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI A PARTIR  
DE GLICEROL RESIDUAL PROVENIENTE DA  
PRODUÇÃO DE BODIESEL**



Rio Claro  
2017

GRAZIELA DE OLIVEIRA TEIXEIRA BALIEIRO

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Pseudomonas aeruginosa*  
LBI 2AI A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL PROVENIENTE DA  
PRODUÇÃO DE BODIESEL

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Barros Lovaglio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de  
Bacharela e licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2017

620.1122 Balieiro, Graziela de Oliveira Teixeira  
B186p Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI a partir de glicerol residual proveniente da produção de biodiesel / Graziela de Oliveira Teixeira Balieiro. - Rio Claro, 2017  
58 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Jonas Contiero  
Coorientadora: Roberta Barros Lovaglio

1. Biodegradação. 2. Biossurfactante. 3. Ramnolipídios. 4. Glicerol. 5. *Pseudomonas aeruginosa*. 6. Biorreator. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP - Adriana Ap. Puerta Buzzá / CRB 8/7987

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de percorrer cada passo até aqui, uma jornada repleta de sonhos, descobertas, desafios e de muita amizade, que contribuíram para minha formação profissional e, sobretudo, como pessoa.

À minha família por todo o apoio, proteção e confiança. Pela possibilidade de compartilharmos conhecimentos e crescermos juntos a cada descoberta proveniente desta etapa da minha vida. Bernardina e Sérgio, meus pais, sou grata a tudo por vocês. Pelo estímulo à busca de meus próprios sonhos e desejos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Contiero pela oportunidade concedida em trilhar essa caminhada de aprendizados. Pela orientação, sempre com muita sabedoria e atenção, e por todo apoio e amizade nesses anos todos.

À minha co-orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Dra. Roberta Barros Lovaglio. Sou grata pela confiança em mim depositada desde o primeiro momento. Pelos anos de muito aprendizado, orientando sempre com muita dedicação e excelência. Uma pessoa que passei a admirar pela competência profissional e pelos laços de grande amizade e fé.

Aos meus amigos da equipe dos Ramnolipídios: Vinícius, Ana Maria e Cíntia pela união, companheirismo, pelos momentos de descontração e ajuda sempre que precisa.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Industrial pela troca de experiências e aprendizados sempre. À Dra. Mary Hellen Palmuti Braga pelo apoio e orientação no início da caminhada no laboratório, com muita paciência, sabedoria e bom-humor.

Aos meus amigos da turma CBN 2012, sou grata em conhecer cada um de vocês e compartilhar durante os últimos cinco anos momentos de união, empatia, alegria, angústias e de muito crescimento; dignos de ótimas memórias.

Ao Diogo Bertoncin, meu amigo, namorado, noivo e marido pelo amor, incentivo, compreensão e sintonia nesses anos todos, diante de cada novo desafio.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho.

A todos que de alguma forma influenciaram minha vida para a realização e conclusão desta etapa. Muito obrigada!

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”  
(Louis Pasteur)

## RESUMO

A utilização do biodiesel como alternativa em substituição aos combustíveis fósseis vem aumentando nos últimos anos. Tendo em vista que a cada tonelada de biodiesel são gerados 100 kg de glicerol, há certa preocupação acerca do destino deste subproduto, já que, sua disposição é dispendiosa economicamente e seu valor no mercado é baixo. Nesse sentido, uma solução a esta problemática é a utilização do glicerol como fonte de carbono na produção de biossurfactantes. Apesar das inúmeras vantagens dos biossurfactantes, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e alta estabilidade, estes compostos não são amplamente utilizados, devido ao alto custo de produção. A aplicação de fontes de carbono alternativas pode contribuir para a redução dos custos de produção e ampliação do uso comercial dos biossurfactantes. O intuito da pesquisa foi verificar o potencial do glicerol de Biodiesel como fonte de carbono na produção de ramnolipídios a partir de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI. Foram avaliadas cinco amostras de glicerol incluindo tratado e não tratado. Os experimentos foram conduzidos em frascos e em biorreator. Os frascos Erlenmeyer foram de 1L contendo 300 mL de meio de cultura e incubados em mesa agitadora durante 120 horas à 37°C e 200 rpm. Os cultivos em biorreator de 13L com 4L de meio de cultura foram realizados durante 160 horas à 37°C, variando a agitação entre 300-900 rpm de maneira a manter a pO<sub>2</sub> em 5%. A fim de ampliar a concentração do biossurfactante, foi realizado cultivo em batelada alimentada com até três pulsos, elevando a concentração do meio em até 30% da inicial. Os resultados mostraram que *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI foi capaz de produzir ramnolipídios a partir de glicerol residual proveniente da produção de Biodiesel nas estratégias utilizadas neste estudo. Os cultivos em biorreator possibilitaram aumento na concentração de produto formado, utilizando os resíduos de Glicerol Tratado e Não Tratado. Concentrações promissoras de ramnolipídios aplicando estas fontes de carbono foram alcançadas, elevando a concentração de ramnolipídios em até 12 vezes em relação à obtida em frascos. O experimento utilizando Glicerol Não Tratado exibiu maior produção do biossurfactante em menos tempo de cultivo. Dessa forma, o uso desta fonte de carbono, em relação ao resíduo tratado, certamente possibilitaria a redução do tempo de cultivo e gastos com tratamento do resíduo. Além disso, constitui uma alternativa para o aproveitamento e valorização deste subproduto e uma estratégia para a redução dos custos de produção de ramnolipídios e da poluição ambiental.

**Palavras-chave:** Ramnolipídios. Glicerol. *Pseudomonas aeruginosa*. Biorreator.

## ABSTRACT

The use of biodiesel as an alternative to fossil fuels has been increasing in recent years. Since each ton of biodiesel is generated 100 kg of glycerol, there is some concern about the destination of this byproduct, as its disposition is economically expensive and its market value is low. This way, a solution to this problem is the use of glycerol as a source of carbon in the production of biosurfactants. Despite the numerous advantages of biosurfactants, such as low toxicity, biodegradability and high stability, these compounds are not widely used due to the high cost of production. The application of alternative carbon sources can contribute to reduce production costs and increase the commercial use of biosurfactants. The aim of this research was to analyze the potential of Biodiesel glycerol as carbon source in the production of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1. Five samples of glycerol, including treated and untreated, were evaluated. The experiments were conducted in flask and Bioreactor. The 1L Erlenmeyer flask containing 300 mL of culture medium were incubated in a rotary shaker for 120 hours at 37°C and 200 rpm. Cultures in 13L bioreactor with 4L of culture medium were carried out for 160 hours at 37°C. The agitation speed varied between 300-900rpm in order to maintain pO<sub>2</sub> in 5%. To improve the biosurfactant concentration, fed-batch culture was performed with up to three pulses of glycerol feeding, increasing the concentration of the medium by up to 30% of initial. The results show that *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 was able to produce rhamnolipids from residual glycerol from Biodiesel production in the strategies used in this study. Bioreactor cultures enabled an increase in the concentration of the product formed, using the treated and untreated Glycerol residues. Promising concentrations of rhamnolipids using these carbon sources were achieved increasing the concentration of rhamnolipids by to 12 times in relation to that obtained in flask. The experiment using Untreated Glycerol showed higher biosurfactant production in less time of cultivation. Thus, the use of this carbon source when compared with the treated residue would certainly make it possible to reduce cultivation time and waste treatment costs. In addition, it is an alternative to the use and recovery of this byproduct and a strategy for reducing the costs of producing rhamnolipids and environmental pollution.

**Keywords:** Rhamnolipids. Glycerol. *Pseudomonas aeruginosa*. Bioreactor.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Biossurfactantes – definição</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2 Classes dos biossurfactantes</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3 Aplicações</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4 Biossíntese de Ramnolipídios</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5 Produção de Biossurfactantes</b> .....	<b>16</b>
<i>2.5.1 Substratos alternativos/ Resíduos</i> .....	<i>16</i>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Gerais</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Micro-organismo</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 Meios de cultura</b> .....	<b>20</b>
<i>4.2.1 Fontes de carbono</i> .....	<i>20</i>
<i>4.2.2 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF)</i> .....	<i>21</i>
<i>4.2.3 Meio Mineral livre de cálcio (MLC)</i> .....	<i>21</i>
<i>4.2.4 Caldo Nutriente (CN) e Luria Bertani (LB)</i> .....	<i>21</i>
<b>4.3 Condições de cultivo</b> .....	<b>21</b>
<i>4.3.1 Preparo do Inóculo</i> .....	<i>21</i>
<i>4.3.2 Produção de Ramnolipídios</i> .....	<i>22</i>
<b>4.4 Métodos Analíticos</b> .....	<b>23</b>
<i>4.4.1 Processamento das amostras</i> .....	<i>23</i>
<i>4.4.2 Avaliação da produção de Ramnolipídios</i> .....	<i>23</i>
<u><i>4.4.2.1 Extração de Ramnolipídios</i>.....</u>	<u><i>23</i></u>
<u><i>4.4.2.2 Determinação da produção de ramnolipídios - Cromatografia em Camada Delgada</i>.....</u>	<u><i>23</i></u>
<u><i>4.4.2.3 Determinação da concentração de ramnolipídios- HPLC</i>.....</u>	<u><i>24</i></u>
<i>4.4.2.3.1 Derivatização</i> .....	<i>24</i>
<i>4.4.2.3.2 HPLC</i> .....	<i>24</i>
<i>4.4.3 Determinação da biomassa microbiana</i> .....	<i>25</i>
<i>4.4.4 Determinação do consumo da fonte de carbono</i> .....	<i>25</i>



<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Experimentos conduzidos em frascos .....</b>	<b>26</b>
5.1.1 <i>Glicerol Pró-Análise (GPA), Glicerol Não Tratado 2.1 (GNT 2.1) e Glicerol Tratado 1 (GT1), como fontes de carbono .....</i>	26
5.1.2 <i>Glicerol Tratado 2 (GT2) e Glicerol Não Tratado 2.2 (GNT 2.2) provenientes da empresa Biocapital.....</i>	31
5.1.3 <i>Comparação dos resultados obtidos ao aplicar Glicerol Tratado (GT1 e GT2) provenientes da produção de biodiesel, como fonte de carbono, de duas empresas distintas: Biocapital e Usina de Candeias da Petrobrás .....</i>	35
5.1.4 <i>Comparação dos cultivos ao aplicar Glicerol Não Tratado (GNT2.1 e GNT2.2) como fontes de carbono, provenientes da mesma empresa, Biocapital, coletados em diferentes datas.....</i>	38
<b>5.2 Experimentos conduzidos em Biorreator .....</b>	<b>41</b>
5.2.1 <i>Glicerol Não Tratado 2.2 (GNT 2.2) conduzido em batelada simples .....</i>	41
5.2.2 <i>Glicerol Não Tratado 2.2 conduzido em batelada alimentada .....</i>	44
<b>5.3 Fatores de conversão .....</b>	<b>48</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos secundários que apresentam atividade superficial e são sintetizados por uma grande variedade de micro-organismos (BANAT *et al.*, 2000; DESAI E BANAT, 1997). A maior vantagem destes compostos quando comparado aos surfactantes sintéticos reside na sua diversidade estrutural, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e produção a partir de substratos renováveis. Os biotensoativos podem ser aplicados em diferentes processos industriais, como produção de fármacos, alimentos, compostos químicos, cosméticos, biorremediação de ambientes poluídos por petróleo e derivados e recuperação terciária do petróleo (BANAT *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2007).

Apesar das vantagens apresentadas, os biossurfactantes não são amplamente utilizados pelas indústrias devido ao alto custo de produção. A utilização de substratos mais baratos, associado à otimização das condições de cultivo e ao desenvolvimento de linhagens mutantes ou recombinantes pode levar à substituição dos surfactantes sintéticos por aqueles de origem biológica (MUKHERJEE *et al.*, 2006).

O mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 apresentou um aumento de 70% na produção de ramnolipídios quando comparada à bactéria selvagem, alcançando 33 g/L de biossurfactante (LOVAGLIO, 2011). A utilização de linhagens com alto potencial de produção, associada ao emprego de ferramentas da engenharia metabólica, contribuirão para a expansão da produção de ramnolipídios em escala comercial. A compreensão do metabolismo envolvido da biossíntese de ramnolipídios é essencial para o desenvolvimento de estratégias que visem o aumento da produção desses biossurfactantes. De acordo com Stephanopoulos e Vallino (1991) o emprego da análise de fluxos metabólicos pode auxiliar na detecção de pontos de ramificação rígidos das rotas metabólicas e ainda contribuir para a superação dos mesmos, gerando melhoras significativas para a produção dos metabólitos de interesse.

De acordo com Guerra-Santos *et al.*, (1984) a fonte de carbono utilizada é um dos principais fatores que influencia a composição e distribuição de homólogos em uma mistura de ramnolipídios. Portanto, o emprego de fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas, podem fornecer informações sobre as rotas metabólicas utilizadas pelo micro-organismo para a síntese da molécula anfipática dos biossurfactantes,

além de permitir o estudo da influência das fontes de carbono na composição de homólogos.

A utilização do biodiesel como alternativa em substituição aos combustíveis fósseis, altamente poluentes, vem aumentando expressivamente. Tendo em vista que a cada tonelada de biodiesel são gerados 100 kg de glicerol (UM et al., 2006), há preocupação acerca do destino deste subproduto. Uma solução a esta problemática é a utilização do glicerol como fonte de carbono na produção de biossurfactantes (SILVA et al., 2009). O uso de fontes de carbono de baixo custo além de linhagens mutantes ou recombinantes com alto potencial de produção pode contribuir para a expansão da produção de ramnolipídios.

O presente estudo visa realizar o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI, para a produção de ramnolipídios, empregando glicerol proveniente da produção de Biodiesel da empresa Biocapital/SP e da Usina de Cadeias/BA, como fonte de carbono, nos cultivos em frascos e em Biorreator.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biossurfactantes – definição

Os biossurfactantes são metabólitos que apresentam atividade superficial. São sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos quando cultivados em diferentes fontes de carbono. Estes compostos são constituídos por uma porção hidrofóbica, usualmente uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica que pode ser um éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxilato ou carboidrato (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). As porções hidrofílicas e hidrofóbicas presentes na molécula de surfactante tendem a se distribuírem na interface de fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Esta distribuição das moléculas é responsável pela principal propriedade desses compostos, que é a capacidade de redução das tensões superficial e interfacial. Estas propriedades os tornam adequados para serem utilizados em diferentes aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT *et al.*, 2000).

### 2.2 Classes dos biossurfactantes

Os surfactantes sintéticos são usualmente classificados de acordo com o grupo polar, entretanto os biossurfactantes são diferenciados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes de biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteína, ácidos graxos e fosfolipídios e biossurfactantes poliméricos (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002). *Pseudomonas aeruginosa* sintetizam glicolipídios denominados ramnolipídios, a porção hidrofílica é composta por moléculas de ramnose, enquanto ácidos 3-hidroxialcanóicos constituem a parte hidrofóbica (JARVIS *et al.*, 1949). Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* são reportados como uma mistura de espécies homólogas de RL1 (Rha2C10C10), RL2(RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) e RL4(RhaC10) (LANG e WAGNER, 1987).

O desenvolvimento de métodos analíticos modernos e sensíveis como a espectrometria de massas, tem permitido a descoberta de uma ampla diversidade de

estruturas de homólogos dos ramnolipídios, aproximadamente 60 congêneres foram descritos (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). A composição e distribuição de homólogos em uma mistura de ramnolipídios são determinadas pela linhagem bacteriana utilizada, condições de cultivo e composição do meio. Já as propriedades do biossurfactante produzido dependem da quantidade e tipo de homólogos presentes (GUERRA-SANTOS, et al., 1984).

### 2.3 Aplicações

Os campos de utilização dos biossurfactantes incluem a agricultura, indústrias farmacêutica, petrolífera, mineração, de alimentos e bebidas, de papel, de produtos de limpeza, de couro e têxtil (FIECHTER, 1992; WANG; MULLIGAN, 2009, ARA; MULLIGAN 2008).

Os biossurfactantes são imensamente aplicados pela indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, assim como em biorremediação e dispersão no derramamento de óleo. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de metabolizar querosene, óleo Diesel e petróleo bruto como única fonte de carbono. A mais alta concentração de ramnolipídio, 9,9 g/L, foi alcançada com 30% de óleo Diesel (PIRÔLLO et al., 2008).

Recentemente, ramnolipídios foram aplicados em um sistema bioeletroquímico para a geração de eletricidade e proporcionou resultados promissores. Zhang et al., (2017) relataram a adição de  $2\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de ramnolipídios às lamas oleosas desidratadas para acelerar a degradação anaeróbica da biomassa e gerar eletricidade em um sistema bioeletroquímico. Os autores observaram que a adição de ramnolipídios aumentou significativamente a produção de energia do sistema e a remoção de contaminantes orgânicos. Além disso, acelerou a hidrólise e a fermentação das lamas de óleo desidratadas resultando em aumento na matéria orgânica solúvel e enriquecimento dos microorganismos participantes do ciclo sulfato/sulfeto. O estudo mostrou que os ramnolipídios podem acelerar a geração de eletricidade e expandir o potencial de aplicação do sistema bioeletroquímico em estudo.

Os biotensoativos possuem propriedade antiadesiva, que impede a formação de biofilmes patogênicos em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções

sem a utilização de drogas sintéticas (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Zhong et al., (2015) investigaram o efeito da baixa concentração de mono-ramnolipídio na adsorção de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas. O biossurfactante foi capaz de reduzir a adsorção de células nas superfícies. Isso porque o tensoativo afeta a hidrofobicidade da superfície celular, mesmo em uma concentração menor que 100 mg/L de ramnolipídio.

Os ramnolipídios também apresentam potencial para o controle dos vetores da dengue, Chikungunya, malária e febre amarela. Prabakaran et al., (2015) descreveram a atividade de di-ramnolipídio contra a pupa dos mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*. A melhor atividade pupicida apresentou concentração letal média (LC50) de 0,003mg/100mL de di-ramnolipídio. Outro trabalho aplicando ramnolipídios com vista a controlar a incidência de dengue, febre amarela e Chikungunya, foi realizado por Silva et al., (2015). Os autores avaliaram o potencial inseticida, larvicida e a atividade repelente deste biossurfactante contra o mosquito *Aedes Aegypti*. Concentrações de 800, 900 e 1000 mg/L de ramnolipídios eliminaram todas as larvas do mosquito em 18 horas e matou 100% dos adultos em 1000 mg/L. Demonstrando assim, o potencial do biotensoativo no controle de larvas e mosquitos, além da atividade repelente contra *Aedes Aegypti*.

Os ramnolipídios podem atuar ainda como antimicrobianos e anticancerígenos (ABALOS et al., 2001; THANOMSUB et al., 2007).

Nitschke et al., (2011) em sua revisão descrevem aplicações de ramnolipídios na agroindústria e indústria alimentícia. Na primeira, os ramnolipídios atuam na proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinérea*, através da inibição da germinação de esporos e crescimento do micélio fúngico. Quando empregados na área alimentícia podem atuar como controladores de consistência, solubilizadores de sabor e na conservação de produtos da panificação.

Além disso, os ramnolipídios podem ser aplicados contra a formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos. Araujo et al.,(2016), avaliaram o potencial de biossurfactantes no controle de biofilmes. Ramnolipídios foram testados contra adesão de micro-organismos como *Listeria monocytogenes* (Gram-positivos) e *Pseudomonas fluorescens* (Gram- negativos) em superfície de poliestireno e aço

inoxidável. Os autores relataram que o tensoativo foi capaz de reduzir a adesão em 79% na superfície de poliestireno e a formação de biofilme em 83% em aço inoxidável. Os autores revelaram o potencial de ramnolipídios contra a formação de biofilmes e consequente contaminação do produto na indústria alimentícia.

Goswami et al., (2015) relataram que ramnolipídios podem atuar no controle da incidência de *red hot* na cana de açúcar, uma doença que tem sido a causa de grande perda nos cultivos em diversos países do mundo. Ela é causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum*. Os ramnolipídios atuam na inibição da germinação de esporos deste fungo. Os pesquisadores observaram que 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ramnolipídios exibiu cerca de 86,6% de inibição da germinação dos esporos do micro-organismo, apresentando importante propriedade antifúngica.

O interesse na síntese biológica de nanopartículas tem aumentado devido à sua excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade. As nanopartículas de ramnolipídios e prata exibiram atividade antibiótica contra patógenos Gram positivos/negativos e leveduras *Candida albicans*, evidenciando o amplo espectro de ação da sua atividade antimicrobiana (GANESH et al., 2010). Zhang e Ju (2011) descreveram a utilização de ramnolipídios para separação de  $\beta$ -glicosidase de uma mistura de enzimas através do fracionamento de espuma. Os ramnolipídios foram utilizados devido a sua propriedade espumante e pela presença de di-ramnose em alguns homólogos, a qual atua como um substrato análogo para a  $\beta$ -glicosidase.

## 2.4 Biossíntese de Ramnolipídios

A estrutura anfipática dos biossurfactantes compreende uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, em muitos casos a síntese das porções hidrofílicas e hidrofóbicas deriva diretamente do metabolismo primário. As rotas para a síntese desses precursores são diversas e utilizam grupos específicos de enzimas, que em muitos casos, além de participarem da síntese, atuam também como enzimas regulatórias (DESAI & BANAT, 1997).

Segundo Syldatk e Wagner (1987), há quatro possibilidades para a síntese de glicolipídios:

- a) Porções hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas por rotas independentes;
- b) Porção hidrofílica é sintetizada *de novo*, enquanto a síntese da metade

hidrofóbica é induzida pelo substrato;

c) A metade hidrofóbica é sintetizada *de novo* e a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato;

d) A síntese de ambas, porções hidrofílicas e hidrofóbicas, é dependente do substrato.

Olvera et al., (1999) concluíram que a conversão biossintética de glicose em ramnose ocorre através da ação da fosfoglicomutase AlgC, já que mutantes algC não produziram ramnolipídios. Essa enzima converte D-glicose-6-fosfato em D-glicose-1-fosfato, a qual é usada por RmlA, RmlB, RmlC e RmlD para produzir dTDP-L-ramnose (OLVERA et al., 1999; ROBERTSON et al., 1994). A síntese de ramnose a partir da oxidação de lipídios fornecidos como fonte de carbono, pode ocorrer a partir do ciclo do glioxilato, onde acetil-CoA, formada na  $\beta$ -oxidação, é convertida à succinato, que é transformado em malato no ciclo do ácido cítrico. O malato é oxidado à oxaloacetato que pela gliconeogênese é convertido em hexoses e posteriormente à ramnose.

Em relação à biossíntese da porção hidrofóbica dos ramnolipídios, Campos-Garcia et al., (1998) relatam a existência do gene *rhIG*, cuja proteína apresenta homologia com NADPH- cetoacilredutases envolvidas na síntese de ácidos graxos. Os autores descrevem que a deleção do gene *rhIG*, não acarretou em mudanças na taxa de crescimento e conteúdo total de lipídios de *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto a produção de ramnolipídios foi totalmente anulada, o que os levou à conclusão de que a proteína RhIG seria responsável pela síntese da porção lipídica dos ramnolipídios.

Déziel et al., (2003) apresentaram evidências de que o gene *rhIA* está envolvido na síntese dos ácidos 3-hidroxicanoicos (AHA), que são os precursores lipídicos dos ramnolipídios e substrato da ramnosiltransferase 1 (RhIB). Eles observaram que em mutantes com deleção nos genes *rhIA* e *rhIB* não havia produção de AHA e ramnolipídios, respectivamente. A homologia de RhIA com transacilases, como a PhaG envolvida na síntese de poli-hidroxicanoatos (PHA), levou a proposição de que RhIA é uma transacilase que catalisa a transferência do  $\beta$ -hidroxidecanoil associado à proteína carreadora de acila (ACP) para a coenzima A (CoA).

Zhu and Rock, (2008) corroboraram com os resultados de Déziel et al., (2003) propondo que só ocorre formação de AHA na presença de RhIA. Esses autores

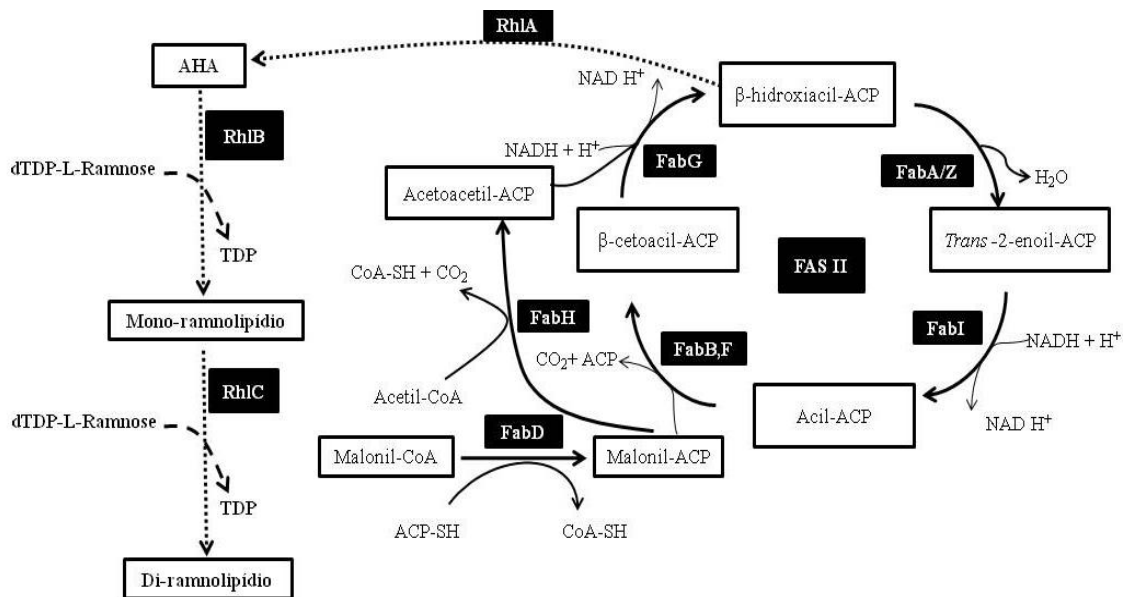


encontraram que a estereoquímica dos  $\beta$ -hidroxiácidos dos ramnolipídios correspondem a intermediários da biossíntese dos ácidos graxos e não à intermediários da  $\beta$ -oxidação, sugerindo que a porção lipídica é sintetizada através da clássica rota de síntese de ácidos graxos a partir de duas unidades de carbono (FASII), sugerindo ainda que o substrato preferencial dessa enzima é  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP, pois ao utilizar  $\beta$ -hidroxidecanoil-CoA não houve síntese de ácido 3- hidroxialcanóico, mesmo em uma concentração de RhIA dez vezes mais alta (Fig. 1). Este estudo refutou a hipótese apresentada por Campos-García et al., (1998) de que o gene rhIG seria responsável pela síntese do precursor lipídico dos ramnolipídios, pois mutantes com deleção em rhIG produziram concentrações de ramnolipídios próxima aquelas sintetizadas pelas linhagens selvagens.

Ao utilizar o mutante randômico rhIG da linhagem de *P. aeruginosa*PAO1, Lovaglio (2011) observou que houve redução na produção de ramnolipídios em fermentações utilizando óleo de girassol como fonte de carbono. É evidente a necessidade de se avaliar a relação desse gene com a produção de ramnolipídios, já que, existem resultados controversos na literatura.

De acordo com esta proposta o primeiro passo da rota envolve a síntese dos precursores do ramnolipídio, dTDP-L-ramnose e  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato. Na próxima etapa eles são unidos pela ramnosiltransferase1, codificada pelo operonrhIB, formando o mono- ramnolipídio (RL2), parte destas moléculas são excretadas e uma outra porção recebe mais uma molécula de ramnose, através da ação da ramnosiltransferase codificada pelo gene rhIC (Fig. 1).

**Figura 1** - Síntese de ácidos graxos e desvio de ácidos 3-hidróxi-alcanóicos (AHA) para a síntese de ramnolipídios.



Fonte: Modificado de ABDEL-MAWGOUD et al., (2011)

## 2.5 Produção de Biossurfactantes

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos devido a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações. Apesar das vantagens apresentadas, os biotensoativos não são amplamente utilizados comercialmente devido aos altos custos de produção, o que está associado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros.

De acordo com Mukherjee *et al.*, (2006) três estratégias devem ser adotadas para tornar os custos do processo de produção mais baixo: (1) substrato - utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo; (2) desenvolvimentos de bioprocessos eficientes para produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo e (3) desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante.

### 2.5.1 Substratos alternativos/ Resíduos

A utilização de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de

baixo custo tais como subproduto agrícola ou de processamento industrial pode reduzir o problema econômico da produção de biossurfactantes. Estima-se que a matéria-prima seja responsável por cerca de 10 – 30% dos custos totais de produção em muitos processos biotecnológicos (MUKHERJEE *et al.*, 2006). Além disto, o aproveitamento de resíduos pode contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados.

Grandes quantidades de resíduos são geradas pela indústria de óleos e gorduras, estes são provenientes tanto da extração como da utilização de óleos vegetais. Estudos demonstraram que resíduos de óleos vegetais podem ser utilizados como substratos para a produção de ramnolipídios por alguns isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (BENINCASA *et al.*, 2002; NITSCHKE *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2005; RAZA *et al.*, 2007).

Outra fonte alternativa é o glicerol, um subproduto que corresponde à 10% (v/v) da produção de biodiesel (MU *et al.*, 2006). No Brasil, a adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo, é obrigatória desde 2008, esta porcentagem aumentou para 6% em julho de 2014 e em novembro de 2014 passou de 6% para 7%; gerando grande quantidade de glicerol devido ao aumento da produção do biocombustível. Na União Europeia, companhias de produção de biodiesel enfrentam problemas em relação ao excesso de glicerol produzido, já que, sua disposição é dispendiosa economicamente e o seu valor de mercado é baixo. Uma solução a este entrave é a utilização do glicerol como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como a produção de biossurfactantes (SILVA *et al.*, 2009).

O glicerol proveniente da produção de biodiesel é produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal. No Brasil, a principal matéria-prima para a produção de biodiesel, cotada em julho de 2017, foi óleo de soja, representando 71% em relação às demais fontes utilizadas, gordura animal representou 16% (ABIOVE, 2017).

O processo de transesterificação consiste na reação entre os triglicerídeos presentes em óleo vegetal ou animal, e álcool (frequentemente metanol) na presença de um catalizador (usualmente de caráter básico, podendo ser NaOH ou KOH) (LEUNG *et al.*, 2010). O resultado da reação é a formação do biodiesel (uma mistura de ésteres de alquila de ácidos graxos) e glicerol como o principal

subproduto (CHATZIFRAGKOU & PAPANIKOLOAOU, 2012).

O glicerol bruto formado nesta reação pode passar por várias etapas de tratamento conferindo diferentes graus de pureza.

Na primeira fase após a reação o glicerol bruto pode apresentar cerca de 30-50% de glicerol e conter uma mistura variável de ácidos graxos livres, álcool (frequentemente metanol), sabão, água, sais, mono, di e triacilgliceróis, éster metílico, e uma variedade de material orgânico (CHATZIFRAGKOU & PAPANIKOLOAOU, 2012 ; LEUNG et al., 2010).

Após essa fase, segue-se a neutralização com ácido, para a retirada de sabão e de ácidos graxos, formando sais (frequentemente cloreto de sódio ou sulfato de potássio) (CHATZIFRAGKOU & PAPANIKOLOAOU, 2012 ; LEUNG et al., 2010).

A terceira etapa consiste na remoção da maior parte da água e metanol, resultando no glicerol que apresenta uma pureza de aproximadamente 80 a 88%, podendo ser comercializado como glicerina loira (LEUNG et al., 2010). Este último pode apresentar ainda resquícios de sais, ácidos graxos livres e metanol (VAN GERPEN 2005; LEUNG et al., 2010).

Quando se deseja o produto mais refinado, é realizado o processo de destilação/troca iônica alcançando pureza de 99% ou mais (LEUNG et al., 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Gerais

Verificar o potencial de produção de ramnolipídios ao cultivar *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI em glicerol proveniente da produção de Biodiesel em frascos e em Biorreator, analisando o crescimento celular, o consumo de substrato e a produção de ramnolipídios.

#### 3.2 Específicos

- Comparar a produção de ramnolipídios produzidos pela linhagem mutante *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI quando cultivada em frascos na presença de Glicerol Pró-Análise, Glicerol Tratado proveniente de duas empresas distintas, e Glicerol Bruto Não Tratado, coletado em diferentes períodos.
- Seleção das melhores fontes de carbono a partir dos resultados obtidos em frascos para a produção de ramnolipídios em Biorreator, no processo em batelada simples.
- Realizar cultivos em batelada alimentada utilizando Glicerol Não Tratado proveniente da empresa Biocapital como fonte de carbono, a fim de ampliar a produção de ramnolipídios produzidos pela *P. aeruginosa* LBI 2AI.
- Comparar os resultados obtidos em batelada simples e batelada alimentada.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismo

O micro-organismo a ser avaliado é a *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI, um mutante randômico, proveniente do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI). O micro-organismo foi mantido acondicionado em tubo criogênico e armazenado em ultra-freezer à -80°C.

### 4.2 Meios de cultura

#### 4.2.1 Fontes de carbono

As fontes de carbono a serem avaliadas estão descritas no Quadro 1

Quadro 1- Fontes de Carbono

<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Empresa Fornecedora</b>
Glicerol Pró Análise (GPA)	Chemco Indústria e Comércio LTDA
Glicerol Tratado (1) (GT1)	Usina de Biodiesel de Candeias/BA Petrobrás
Glicerol Tratado (2) (GT2)	Biocapital Consultoria Empresarial e Participações S.A. – Charqueada/SP
Glicerol Não Tratado (2.1) (GNT 2.1)	Biocapital Consultoria Empresarial e Participações S.A. – Charqueada/SP
Glicerol Não Tratado (2.2) (GNT 2.2)	Biocapital Consultoria Empresarial e Participações S.A. – Charqueada/SP

As amostras de Glicerol Não Tratado (GNT 2.1 e GNT 2.2) foram fornecidas pela mesma empresa, porém foram coletadas em datas distintas. A amostra (2.1) foi fornecida em fevereiro de 2013 e a amostra (2.2), em junho de 2015.

#### 4.2.2 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF)

Este meio foi utilizado para o preparo do inóculo das fermentações conduzidas em frascos Erlenmeyer e em Biorreator. Sua composição consiste em (g/L): MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O - 0,05; KCl - 0,1; NaNO<sub>3</sub> - 1,5; fonte de carbono - 40 ; tampão fosfato 0,1M pH 6,5 e 1 mL/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g/L): citrato de sódio dihidratado - 2,0; FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O - 0,28; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O - 1,4; CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O - 1,2; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O - 1,2; MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O - 0,8.

#### 4.2.3 Meio Mineral livre de cálcio (MLC)

Para a produção de ramnolipídios utilizou-se o seguinte meio (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,3; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O - 0,5; KCl - 1,0; NaNO<sub>3</sub> - 15; fonte de carbono (g/L de resíduo) - 100 (para os experimentos conduzidos em frascos utilizando GPA, GT1, GNT 2.1) e 80 (para experimentos em frascos utilizando GNT2.1 e GT2 e em biorreator utilizando GNT 2.2). O volume e a composição da solução de elementos traços utilizada foram os mesmos descritos no item anterior. A massa de reagente utilizada, nos meios descritos acima, foi baseada no volume de solução aquosa, não considerando o volume da fonte de carbono adicionado.

#### 4.2.4 Caldo Nutriente (CN) e Luria Bertani (LB)

A composição dos meios para o pré-cultivo dos micro-organismos em (g/L) foi: peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona - 10; extrato de levedura - 5,0 e NaCl - 10 (LB).

### 4.3 Condições de cultivo

#### 4.3.1 Preparo do Inóculo

Primeiramente os micro-organismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio CN e 1,5 mL da cultura estoque da linhagem a ser avaliada, a incubação foi feita em mesa agitadora, durante 24 horas

à 37°C e 200 rpm. Em seguida foram transferidos 5mL, do pré-cultivo para frascos de 500 mL com 100 mL de MLCTP e incubou-se por 24 horas à 37°C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação da fase aquosa resultando em uma  $D.O_{580nm}$  inicial de 0,08.

#### 4.3.2 *Produção de Ramnolipídios*

A primeira etapa dos experimentos, em que foi avaliada a produção de ramnolipídios utilizando os diferentes resíduos, foi feita em frascos Erlenmeyer de 1L, contendo 300 mL de MLC. Após inoculação, como descrito no item anterior, os frascos foram incubados em mesa agitadora durante 120 horas à 37°C e 200 rpm. As amostras para avaliação do crescimento, consumo da fonte de carbono, produção de ramnolipídios foram retiradas a cada 24 horas. Os cultivos foram feitos em triplicata.

Após a seleção das melhores fontes de carbono, os experimentos para avaliar a produção de ramnolipídios foram realizados em biorreator de 13L, contendo de 4L de MLC. Os cultivos foram conduzidos em batelada simples e alimentada, com controle de temperatura, pH, pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) e nível de espuma. Ajustou-se a temperatura para 37°C e o pH para 6,8. A aeração foi fixada em 1L de ar atmosférico/min. A velocidade da agitação variou entre 300 e 900 rpm de maneira a manter a  $pO_2$  em 5%. Antiespumante foi adicionado ao atingir o sensor de acordo com o tempo e intervalo de injeção: 2s a cada 120s. A saída de gases foi monitorada ao longo do cultivo. As amostras para avaliação do crescimento, consumo da fonte de carbono, produção de ramnolipídios, foram retiradas a cada 12 horas durante 160h. Nos tempos: 20, 40, 70 e 120 horas de cultivo, foi injetado solução de elementos traços.

No presente estudo foram descritos dois experimentos em batelada alimentada utilizando pulso de alimentação. O primeiro cultivo, batelada alimentada (1), foi conduzido com apenas um pulso. A alimentação foi acionada quando houve queda na concentração de glicerol e fase log de crescimento celular, observados no processo em batelada simples. O volume de glicerol usado na alimentação foi calculado para elevar a concentração da fonte de carbono do meio de cultivo em 50g/L. O segundo experimento, batelada alimentada (2), foi conduzido com a adição de fonte de carbono em três pulsos. Estes foram realizados a fim de



elevar a concentração de glicerol do meio de cultivo em 15, 10 e 15 g/L, respectivamente, quando a concentração da fonte de carbono no meio de cultivo fosse menor que 5g/L.

#### **4.4 Métodos Analíticos**

##### *4.4.1 Processamento das amostras*

Para os cultivos em frascos, o volume amostra retirado de cada Erlenmeyer foi de 10mL, para quantificação de biomassa, ramnolipídios e consumo da fonte de carbono. Cada amostra foi centrifugada a 4000 rpm, 4°C e 30 min para a separação das duas fases: células/fase aquosa.

O volume de amostra retirado do biorreator foi de 20 mL, este foi dividido em dois de 10 mL, para a quantificação de biomassa, ramnolipídios e consumo da fonte de carbono. Cada amostra foi centrifugada a 10000 rpm, 4°C e 30 min para a separação das duas fases: células/fase aquosa.

##### *4.4.2 Avaliação da produção de Ramnolipídios*

###### 4.4.2.1 Extração dos ramnolipídios

A extração foi feita com o caldo livre de células a partir do qual foi adicionado H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% 1:100 (v/v) levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do tensoativo foi utilizado acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitação por 10min, em seguida a mistura foi mantida em repouso, e então retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em rotavapor e obtenção do ramnolipídio. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

###### 4.4.2.2 Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica-gel e como fase – móvel utilizou-se a seguinte mistura: clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2). O agente revelador é composto por 2mL de anisaldeído em 100

mL de ácido acético acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico. Foram aplicados 12 $\mu$ L dos extratos obtidos a partir do caldo livre de células em diferentes tempos de fermentação, além dos padrões de ramnolipídios obtidos pela Jeneil Biosurfactant Company.

#### 4.4.2.3 Determinação da concentração de Ramnolipídios – HPLC

##### 4.4.2.3.1 Derivatização

Para que os ramnolipídios fossem analisados via detector UV, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com o que foi descrito por Schenk et al., (1995), com pequenas modificações. As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360  $\mu$ L de acetonitrila e 40  $\mu$ L da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40mM e Trietilamina 20mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um banho seco com agitação.

##### 4.4.2.3.2 HPLC

As análises foram feitas com um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV. Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio nas seguintes concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g/L. Para as análises utilizou-se uma coluna de fase reversa (Shim-pack VP-ODS, Shimadzu - 150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m sílica gel) à 30°C. As fases móvel foram Solução A com 5% de metanol e Solução B com 95%, ambas em água ultra pura. Para que houvesse separação dos homólogos presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 à 100% da Solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da sol. B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida ocorreu um decréscimo para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm. Os tempos de retenção foram 23,4 $\pm$  0,1 min pra Rha-Rha-C10C10 e 24,2 $\pm$  0,1 min para Rha-C10C10.

#### *4.4.3 Determinação da biomassa microbiana*

A avaliação do crescimento microbiano foi feita por método gravimétrico, onde o pellet de células foi ressuspensão em NaCl 0,85% (v/v) (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 10.000, 4°C e 20 min. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantidos em estufa à 100°C até atingir peso constante.

#### *4.4.4 Determinação do consumo da fonte de carbono*

A análise do glicerol foi feita em HPLC, como descrito por McGinley e Mott., (2008) com pequenas modificações. Para as análises utilizou-se a coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) da Phenomenex à 60°C; o volume de amostra injetado e o fluxo foram 20 µL e 0,6 mL/ min, respectivamente. Ácido sulfúrico 5mM foi usado como fase móvel. O tempo de retenção foi  $14,8 \pm 0,1$  min.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimentos conduzidos em frascos

#### 5.1.1 Glicerol Pró-Análise (GPA), Glicerol Não Tratado 2.1 (GNT 2.1) e Glicerol Tratado 1 (GT1), como fontes de carbono

A seguir serão descritos os resultados de crescimento, consumo da fonte de carbono e produção de ramnolipídios (Fig. 2 a, b, c; respectivamente) obtidos com a linhagem mutante *P. aeruginosa* LBI 2AI, ao empregar como fontes de carbono Glicerol Pró-Análise (GPA), Glicerol Tratado proveniente da empresa de Candeias (GT1) e Glicerol Não Tratado 2.1, proveniente da empresa Biocapital (GNT 2.1).

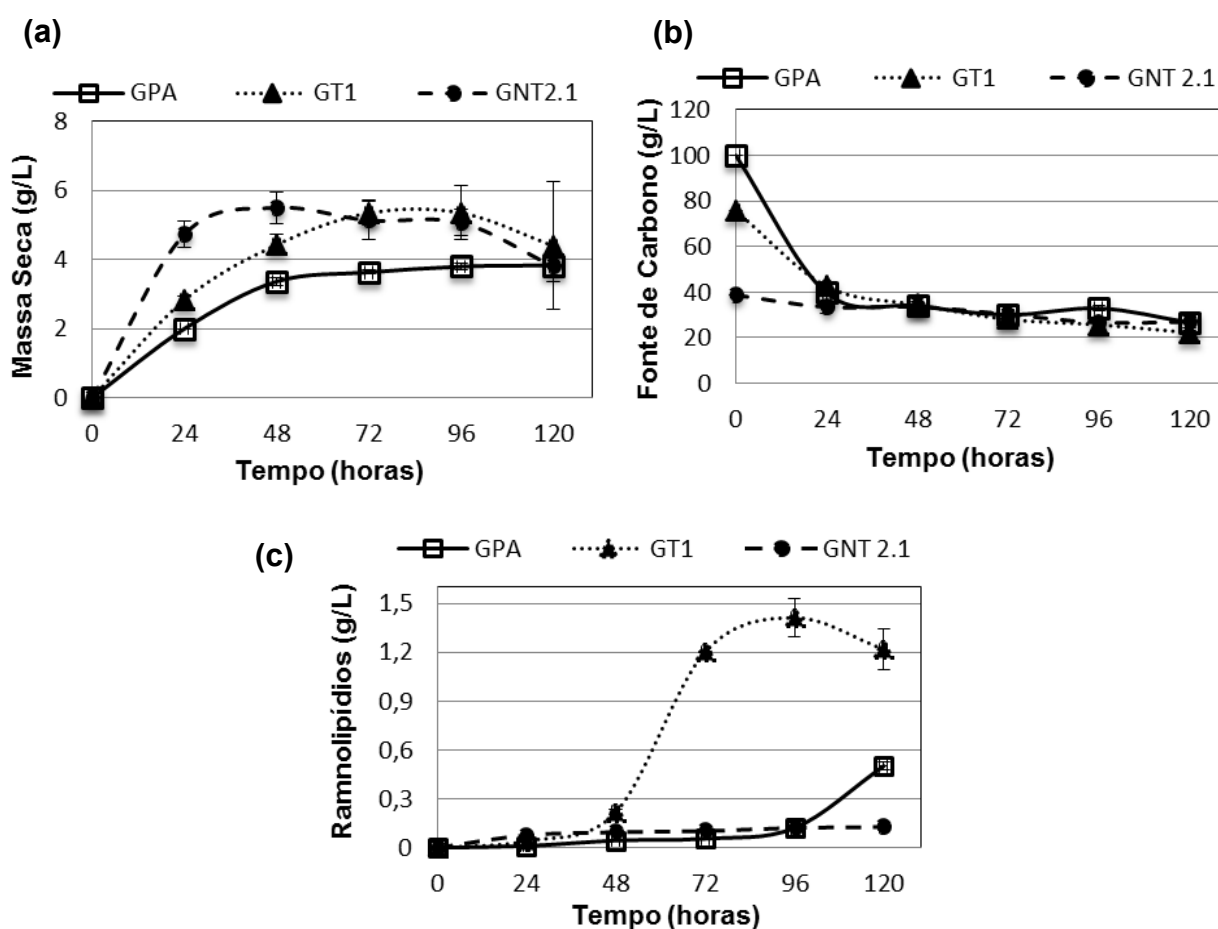
Nas primeiras 24 horas o crescimento microbiano utilizando glicerol não tratado sobressaiu-se em relação às demais fontes de carbono. Ao mesmo tempo foi a fonte na qual houve menor consumo de glicerol. Pelo fato deste substrato constituir-se resíduo bruto da produção de Biodiesel feito a partir de óleo, pode conter resquícios de ácidos graxos e possivelmente influenciar o crescimento microbiano.

De acordo com Pagliaro e Rossi (2010) o glicerol bruto pode conter uma mistura variável de ácidos graxos livres, glicerol, álcool (frequentemente metanol), sabão, água, sais, mono, di e triacilgliceróis, éster metílico, e uma variedade de material orgânico. A presença de ácidos graxos livres ou mesmo ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no glicerol bruto não tratado pode indicar que o micro-organismo utilizou parte da energia e dos produtos da metabolização dos ácidos graxos para a multiplicação celular e produção de ramnolipídios logo no início do cultivo.

Ashby et al., (2004) observaram que *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas corrugata* cultivadas em glicerol, coproduto da produção de Biodiesel a partir de óleo de soja, foram capazes de crescer e produzir PHB [poli (3-hidroxi-butirato)] e polihidroxicanoato de cadeia média, e que os ácidos graxos livres e ésteres metílicos poderiam ser utilizados como fonte de carbono pela bactéria. Os autores também relatam a ocorrência da estabilização da fase estacionária tanto em termos de crescimento quanto de produção de PHB por *P. oleovorans*. Este resultado corrobora com os resultados encontrados neste estudo,

que podem ser observados na Fig. 2 a,c. Ainda sobre o estudo supracitado, os autores indicam que a presença do metanol pode ter provocado um ritmo mais lento da utilização do glicerol. Assim, é possível inferir que no início do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, dada a presença de resquícios de ácidos graxos na fonte de carbono, o micro-organismo provavelmente direcionou a metabolização dos ácidos graxos para o crescimento e produção de ramnolipídios. A queda subsequente na concentração de ácidos graxos no meio, associada à presença de metanol, pode ter desacelerado a metabolização de glicerol, levando à fase estacionária antecipadamente (Fig. 2 a, c).

**Figura 2:** Perfil de crescimento (a), consumo de substrato (b) e produção de ramnolipídios (c) durante o cultivo de *P. aeruginosa* LBI 2A1 ao utilizar glicerol PA (GPA), Glicerol Tratado 1 (GT1) e não tratado (GNT2.1), como fontes de carbono



O destaque no crescimento celular empregando glicerol não tratado 2.1 (GNT2.1) continua até aproximadamente 72 horas de cultivo, quando a biomassa referente ao uso do glicerol tratado (GT1) ultrapassa-o, continuando maior do que com as outras fontes de carbono, até o final do processo (Fig. 2 a).

No que se refere ao consumo de glicerol, nas primeiras 24 horas de cultivo o micro-organismo consumiu maior quantidade de Glicerol PA quando comparado com as outras fontes de carbono, metabolizando cerca de 60 g/L de glicerol o que representa 82% do total consumido ao longo do bioprocessamento. Já o Glicerol Não Tratado foi a fonte menos consumida nesse intervalo, cerca de 5g/L que representa 45% do total metabolizado durante todo o cultivo. Após esse período o perfil das curvas foram semelhantes nas diferentes fontes de carbono analisadas (Fig. 2b).

A linhagem *P.aeruginosa* LBI 2AI foi capaz de sintetizar ramnolipídios nas três fontes de carbono verificadas, contudo o perfil de produção foi distinto entre elas. A reduzida produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2AI, nos cultivos utilizando glicerol bruto (GNT2.1), pode ser decorrente da presença de alta concentração de sais. Yang et al., (2014) observaram que a presença de  $2.0\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  em meio com pH acima de 7 levou à inibição na produção de lipídios, pela levedura oleaginosa *Rhodospirium toruloides* Y4.

De acordo com Chee et al., (2010) e Chatzifragkou et al. (2012), há quantidades variáveis de sabão e sais como NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  no glicerol bruto. Nesta fonte de carbono, o fósforo destaca-se dentre os elementos Ca, Mg, S e Na (THOMPSON; He, 2006). No caso específico de ramnolipídios baixas proporções de C/P podem inibir a produção desses compostos (MULLIGAN et al., 1989). Sendo assim, elevada presença de fósforo associada ao baixo grau de pureza que varia entre 40 e 50 % (VAN GERPEN 2005; LEUNG et al., 2010) pode ter contribuído para a reduzida produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI.

A presença de pequenas quantidades de íons (Mg, Ca) presentes no glicerol residual, podem contribuir de maneira benéfica para o metabolismo geral das células. Sabe-se que íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  são constituintes da parede celular de *P. aeruginosa* (EAGON et al., 1965). Além disso, Hassen et al., (1998) demonstram que cátions metálicos exercem grande influência na síntese proteica em *P. aeruginosa*. Esses íons podem atuar como mediadores nos mecanismos de

controle de transcrição ou tradução de enzimas envolvidas no metabolismo de *P. aeruginosa* (MARTINS et al., 1990).

Cavalheiro et al., 2009 investigaram a produção de PHB (poli-3-hidroxibutirato), pela linhagem *Cupriavidus necator* usando glicerol residual de biodiesel a partir de óleos vegetais, e observaram que a produção foi significativamente menor em glicerol bruto em comparação ao glicerol puro, provavelmente pela presença de sais de sódio em sua cultura. Os estudos supracitados, os quais discorrem sobre a inibição da produção de lipídios por *Rhodospirium toruloides* Y4 e de PHB por *Cupriavidus necator* – ambos constituídos por ácidos graxos – ocorreram em altas concentrações de sais (YANG et al., 2014; CAVALHEIRO et al., 2009). Estas observações associadas aos resultados obtidos no presente estudo levam a inferir que o excesso de sais presente no glicerol bruto provavelmente interfere na biossíntese de lipídios e conseqüentemente na formação de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1.

Conforme a Fig. 2 c, a partir de 48 horas o uso do Glicerol Tratado1 (GT1) destacou-se com aumento na produção do biossurfactante, atingindo em 96 horas uma concentração mais do que 10 vezes superior à concentração com GPA ( $p=0,000$ ) e GNT 2.1 ( $p=0,000$ ).

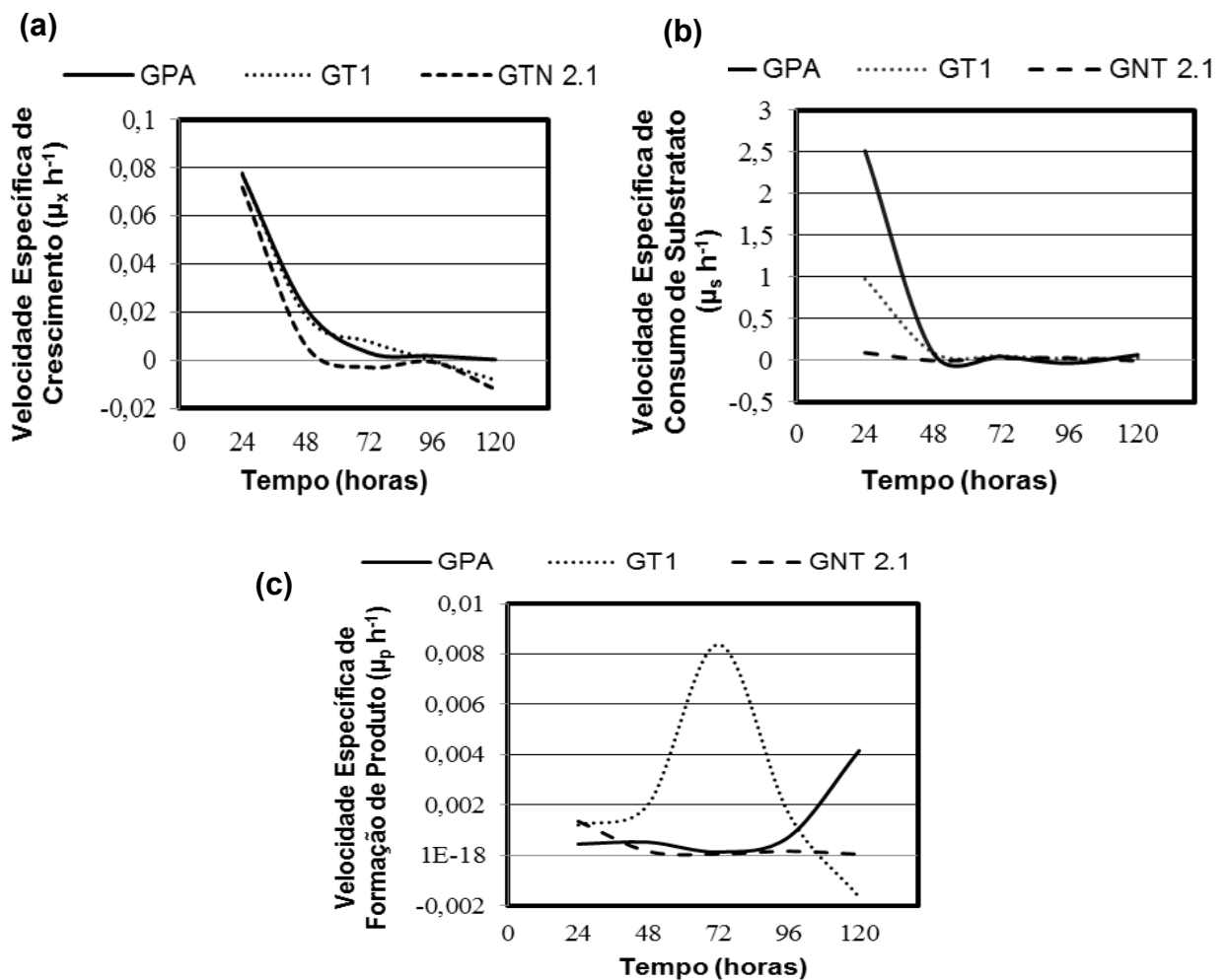
De acordo com a literatura, o glicerol tratado proveniente da produção de biodiesel pode apresentar resquícios de sais, ácidos graxos livres e metanol (cerca de 2%) apresentando uma pureza de aproximadamente 80 a 88% (VAN GERPEN 2005; LEUNG et al., 2010). A redução de componentes que possivelmente prejudicam a metabolização da fonte de carbono e a produção de ramnolipídios tais como metanol e sais, respectivamente, pode ter possibilitado o consumo do glicerol com mais eficiência. Além disso, a presença de ácidos graxos no meio de cultivo certamente influenciou de modo positivo, tanto a produção de ramnolipídios quanto o crescimento celular.

Nota-se ainda, que mesmo apresentando aumento ao final do cultivo, a produção do tensoativo com glicerol PA ainda foi menor que a obtida com as outras fontes (Fig. 2 c).

Quando a fonte de carbono utilizada foi o glicerol não tratado, a velocidade específica de crescimento foi menor durante todo o cultivo, com destaque para o período entre 48 e 72 horas (Fig. 3 a). A velocidade de multiplicação foi próxima com glicerol tratado e glicerol PA até 48 horas.

A velocidade específica de consumo do glicerol PA foi 2,5 e 25 vezes maior que a do glicerol tratado e não tratado, respectivamente. A partir de 48 horas as velocidades se igualam até o final do cultivo (Fig. 3 b).

**Figura 3:** Velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ), consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e formação de produto ( $\mu_p$ ) (a,b,c, respectivamente) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2AI, cultivada em Glicerol PA (GPA), Glicerol Tratado (GT1) e não tratado (GTN2.1)



No que tange à produção de ramnolipídios, a velocidade específica de produção foi semelhante com glicerol tratado e não tratado nas primeiras 24 horas. A partir de 48 horas a velocidade com glicerol tratado passa a aumentar expressivamente atingindo seu maior pico em 72 horas. Há que se ressaltar que ainda que o valor máximo da velocidade específica de crescimento ocorra em 72 horas o pico de maior concentração de produto sucede em 96 horas (Fig. 3 c).



Contudo, o aumento na concentração de ramnolipídios entre 72 e 96 horas foi de apenas 0,2 g/L. Sendo assim, embora as concentrações de produto nesse período de tempo sejam estatisticamente distintas ( $p=0,037$ ), talvez possa não compensar manter o bioprocesso por 96 horas por conta de uma concentração adicional tão sutil. Desse modo, o uso do Glicerol Tratado 1 (GT1) como fonte de carbono para a produção de ramnolipídios pode ser mais eficiente; já que atinge concentração e velocidade específica de produção consideravelmente maior que a dos demais substratos em um menor tempo de cultivo (72 horas).

Lovaglio, (2011) utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono, alcançou uma produção com o mesmo micro-organismo de  $2,9 \pm 0,10$  g/L. Em 72 horas a concentração obtida com Glicerol Tratado 1 (GT1), no presente estudo, foi de  $1,20 \pm 0,005$ . Embora este valor seja menor que o obtido com a autora supracitada, é preciso considerar o processo de purificação do tensoativo, de modo a analisar qual desses resíduos acarretará menores custos com a etapa de purificação do produto.

Alterar os parâmetros físico-químicos das condições de cultivo a fim de ajustar o momento de maior produção com o de velocidade máxima de formação de produto seria uma tentativa para ampliar a concentração de ramnolipídios formados em 72 horas (1,2 g/L). Isso poderia levar à redução de custos energéticos de produção, tempo e volume de substrato utilizado. Além disso, ao usar um resíduo excedente da produção de Biodiesel, possibilita a redução de despesas quanto à fonte de carbono utilizada, e, ao mesmo tempo, constitui uma alternativa para o aproveitamento e valorização deste subproduto.

Constata-se ainda que no cultivo com glicerol PA e tratado a produção de ramnolipídios iniciou-se após a desaceleração do crescimento microbiano, caracterizando-o como um metabólito secundário. Já com glicerol não tratado 2.1, a velocidade máxima de produção coincide com a máxima de crescimento, logo, o biossurfactante, neste caso é produzido como um metabólito primário.

#### *5.1.2 Glicerol Tratado 2 (GT2) e Glicerol Não Tratado 2.2 (GNT 2.2) provenientes da empresa Biocapital*

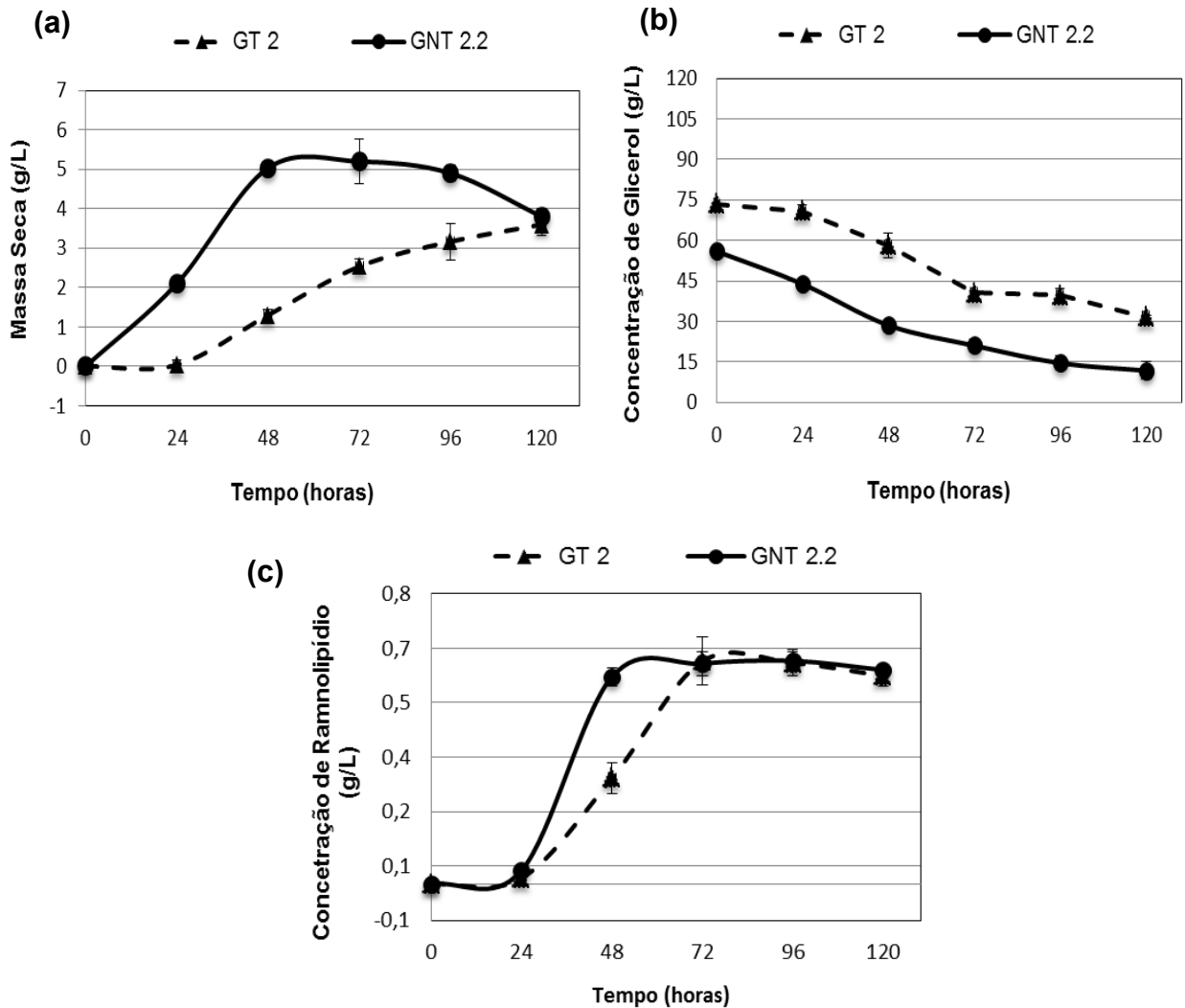
No decorrer da pesquisa o resíduo tratado GT1, que apresentou melhor resultado em frascos, se esgotou e não foi possível adquiri-lo da mesma empresa.

Dessa forma, foram aplicados na pesquisa dois novos resíduos coletados da empresa Biocapital - Glicerol Tratado (GT2) e Não tratado (GNT 2.2). Foi necessário realizar cultivos em frascos para selecionar a melhor fonte de carbono para experimentos em biorreator.

A seguir serão descritos os resultados de crescimento, consumo da fonte de carbono e produção de ramnolipídios, nos experimentos conduzidos em frascos (Fig. 4 a, b, c; respectivamente) utilizando a linhagem mutante *P. aeruginosa* LBI 2AI, e como fonte de carbono Glicerol Tratado 2 (GT2) e Glicerol Não tratado 2.2 (GNT2.2) proveniente da produção de Biodiesel da empresa Biocapital.

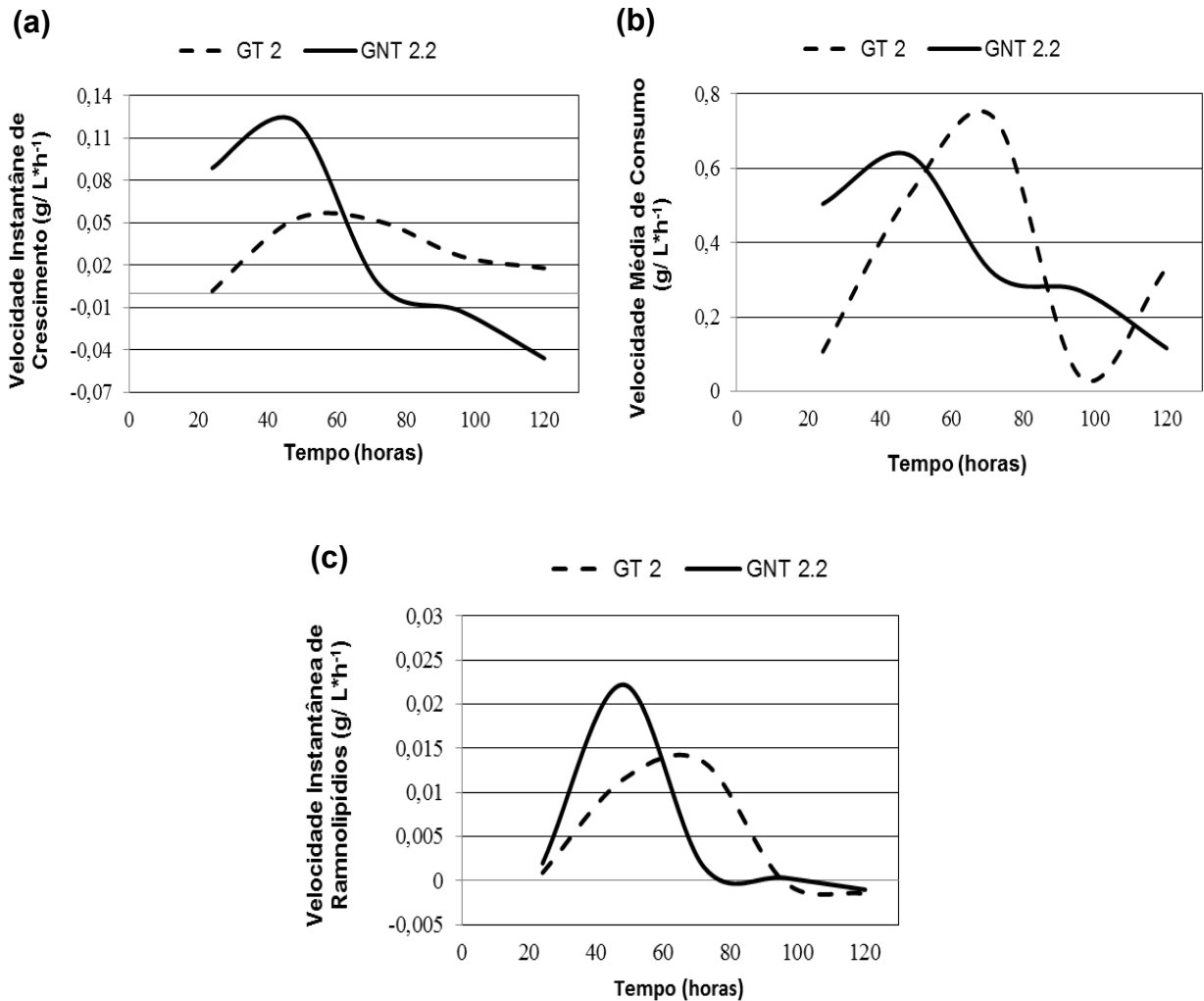
O crescimento do micro-organismo ao empregar Glicerol Não Tratado 2.2 mostrou-se superior ao alcançado com Glicerol Tratado 2, durante todo o cultivo (Fig.4a). Em 48 horas a concentração de biomassa chega a ser aproximadamente 4 vezes superior à alcançada com GT2. (Fig.4a). A concentração de substrato consumido foi semelhante para as duas fontes de carbono, totalizando ao final do cultivo um consumo de  $43 \pm 1$  g/L (Fig.4b). Em relação à produção de ramnolipídios, a linhagem foi capaz de produzir o biossurfactante nos dois resíduos analisados (Fig 4c). Contudo, em 48 horas de cultivo é possível observar que a concentração do bioproducto utilizando Glicerol Não Tratado foi cerca de 2 vezes superior à obtida com o Tratado. Nota-se ainda, que após 72 horas de cultivo não há aumento na produção do biossurfactante, para as duas fontes de carbono. Dessa forma, o cultivo com GNT 2.2 apresenta-se mais interessante, com um processo de apenas 48 horas.

**Figura 4:** Perfil de crescimento (a), consumo de substrato (b) e produção de ramnolipídios (c) durante o cultivo de *P. aeruginosa* LBI 2A1 ao utilizar Glicerol de Biodiesel Tratado (GT2) e Não Tratado (GNT 2.2) da empresa Biocapital como fonte de carbono nos experimentos em Frasco.



Em relação à velocidade instantânea de consumo de Glicerol Não Tratado, observa-se que em 24 horas de cultivo, ela é cerca de 5 vezes superior à alcançada com Glicerol Tratado (Fig. 5b). No mesmo período e com a mesma fonte de carbono a velocidade de crescimento é também superior, quando comparada com glicerol tratado; exibindo velocidade cerca de 50 vezes maior (Fig. 5a). Neste tempo a concentração de ramnolipídios é baixa para as duas fontes de carbono analisadas. Desse modo, os produtos da metabolização do glicerol certamente foram direcionados para a multiplicação celular.

**Figura 5:** Velocidades instantâneas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto (a,b,c, respectivamente) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2AI, cultivada em Glicerol Tratado (GT2) e Não Tratado (GNT 2.2), como fontes de carbono, da empresa Biocapital nos experimentos em Frasco.



Os picos das velocidades instantâneas de crescimento, consumo e produção de ramnolipídios ocorrem em 48 horas para GNT2.2 e 72 horas para GT2 (Fig 5 a, b e c). Os valores para Glicerol Não Tratado são 2 vezes superiores aos exibidos com Glicerol Tratado, correspondentes às velocidades de crescimento e produção de ramnolipídios; já para velocidade de consumo, o pico é inferior para Glicerol Não Tratado (cerca de 15%).

Constata-se que os períodos das velocidades máximas de crescimento, consumo e produção de ramnolipídios coincidem. Isso ocorre para as duas fontes de carbono, entretanto para o GNT 2.2 isso ocorre em um menor tempo de cultivo (com

aproximadamente 24 horas de diferença) (Fig. 5 a,b e c). Tais resultados associados ao propósito de redução de custos de tratamento do resíduo contribuíram para a seleção do Glicerol Não Tratado 2.2 (GNT 2.2) para o experimento conduzido em Biorreator (experimentos descritos nas seções 5.2.2 a 5.2.5) a fim de ampliar a concentração de ramnolipídios a partir deste resíduo industrial.

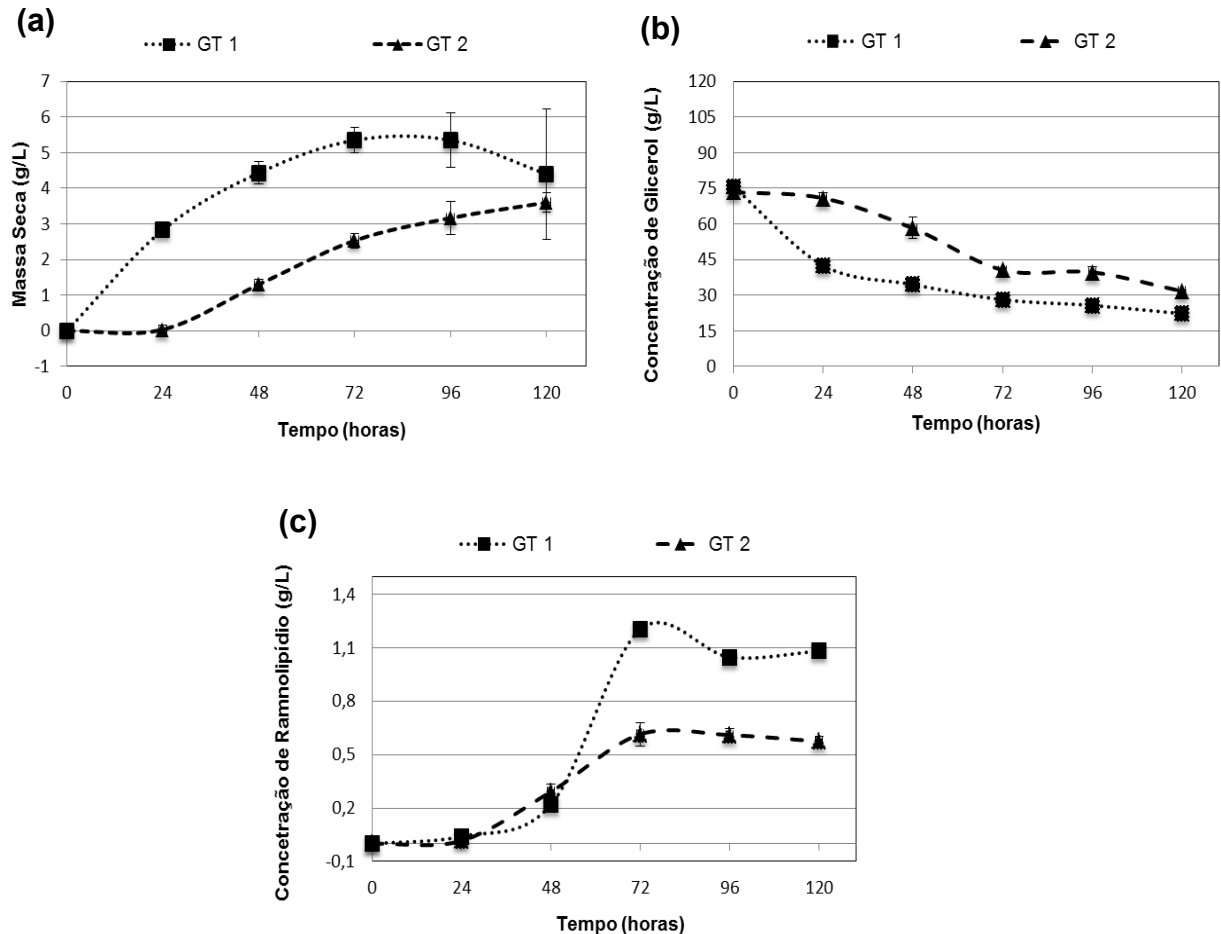
Vale ressaltar, que o biossurfactante é produzido como um metabólito primário para as duas fontes de carbono analisadas, uma vez que a velocidades máxima de produção coincide com a velocidade máxima de crescimento (Fig.5 a,c).

### *5.1.3 Comparação dos resultados obtidos ao aplicar Glicerol Tratado (GT1 e GT2) provenientes da produção de biodiesel, como fonte de carbono, de duas empresas distintas: Biocapital e Usina de Candeias da Petrobrás*

A seguir serão descritos os resultados de crescimento, consumo da fonte de carbono e produção de ramnolipídios durante o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI ao crescer em Glicerol Tratado, como fonte de carbono, proveniente do processo de produção de Biodiesel das empresas: Biocapital (GT1) e Usina de Candeias da Petrobrás (GT2) (Fig. 6).

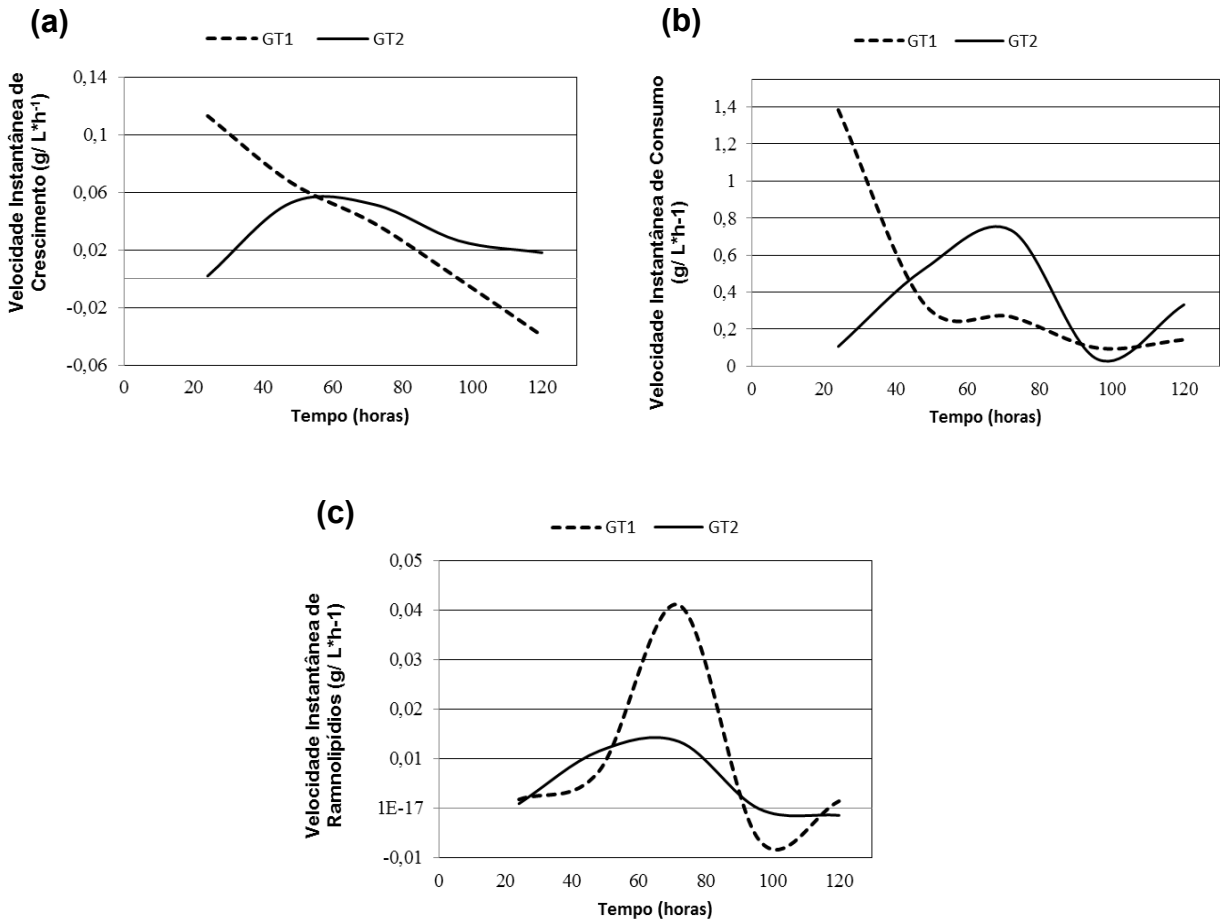
Quando a fonte de carbono utilizada foi o GT2 o crescimento microbiano foi superior ao alcançado com GT1, durante todo o cultivo (Fig. 6a). O consumo de GT2 foi cerca de 30% superior ao do GT1 (Fig. 6b). O perfil de produção de ramnolipídios para os resíduos das duas empresas foi semelhante até 48 horas de cultivo, apresentando baixa produção do biossurfactante (Fig. 6c). Após este período, a produção do tensoativo com GT1 em 72 horas (1,20 g/L) superou à obtida com GT2 (0,614 g/L), alcançando o dobro da concentração de ramnolipídios (Fig. 6c). Souza et al., (2011) ao cultivar *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 em glicerol hidrolisado, coproduto da produção de biodiesel, relataram 1,26g/L de ramnolipídios em 96 horas de cultivo. Esta concentração é semelhante à alcançada no presente estudo com Glicerol Tratado 1 (1,20 g/L) em 72 horas de cultivo.

**Figura 6:** Perfil de crescimento (a), consumo de substrato (b) e produção de ramnolipídios (c) durante o cultivo de *P. aeruginosa* LBI 2A1 ao utilizar Glicerol Tratado de Biodiesel (de duas indústrias diferentes), como fonte de carbono, nos experimentos em Frasco.



Os picos das velocidades de crescimento, consumo e produção de ramnolipídios para GT1 exibiram valores no mínimo duas vezes maiores aos alcançados com o uso de GT2 (Fig. 7 a, b e c). Os picos de velocidade instantânea de síntese de ramnolipídios coincidiram no tempo de cultivo, porém as velocidades de produção foram expressivamente distintas. Em 72 duas horas, a velocidade de produção com GT1 foi cerca de 4 vezes superior à alcançada com GT2 (Fig. 7c). Isso refletiu na maior concentração de ramnolipídios alcançada com esta fonte de carbono nos cultivos comparados (Fig. 6 c).

**Figura 7:** Velocidades instantâneas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto (a,b,c, respectivamente) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2AI, cultivada Glicerol Tratado de Biodiesel (de duas indústrias distintas), como fontes de carbono, nos experimentos em Frasco.



A partir destes resultados, é possível inferir que há diferença na metabolização dos resíduos tratados coletados nas duas empresas distintas. Embora ambos os resíduos tenham passado por tratamento, a constituição destes podem ser específicas para cada empresa ou lote. A variação pode estar na origem da matéria-prima utilizada para a produção do biodiesel, no método de transesterificação, na separação dos compostos formados, bem como no processo de tratamento do subproduto (CHATZIFRAGKOU & PAPANIKOLAOU, 2012).

#### 5.1.4 Comparação dos cultivos ao aplicar Glicerol Não Tratado (GNT2.1 e GNT2.2) como fontes de carbono, provenientes da mesma empresa, Biocapital, coletados em diferentes datas.

A seguir serão descritos os resultados de crescimento, consumo da fonte de carbono e produção de ramnolipídios dos experimentos conduzidos em frascos (Fig.8 a, b, c; respectivamente) obtidos com a linhagem mutante *P. aeruginosa* LBI 2AI, ao empregar, como fonte de carbono, duas amostras de Glicerol Não Tratado proveniente da empresa Biocapital coletados em diferentes datas. A amostra de Glicerol Não Tratado 2.1 foi coletada em fevereiro de 2013 e a amostra 2.2, em junho de 2015.

No período compreendido entre 0 e 48 horas de cultivo, o crescimento microbiano com GTN 2.2 foi o dobro que o apresentado com GTN 2.1. Após este período, o perfil das curvas e a concentração de biomassa assemelham-se durante todo o cultivo (Fig. 8a).

Com relação ao consumo de substrato, o micro-organismo foi capaz de metabolizar cerca de 80% do GNT 2.2 disponibilizado no experimento e apenas 30% do GNT 2.1 (Fig. 8b). A produção de ramnolipídios foi baixa para os dois substratos até 24 horas de cultivo. Em seguida, a concentração do biossurfactante ao empregar Glicerol Não Tratado 2.2 passa a aumentar, atingindo em 72 horas uma concentração aproximadamente 6 vezes superior à alcançada com Glicerol Não Tratado 2.1 (Fig. 8c). As maiores concentrações de ramnolipídios obtidas com GNT 2.1 e GNT 2.2 foram 0,126g/L em 120 horas e 0,615g/L em 96 horas, respectivamente. Este último apresentou concentração cerca de 174% superior ao alcançado por Souza et al., (2011), (0,354g/L) ao utilizar glicerol bruto (sem tratamento) subproduto da indústria de Biodiesel, como fonte de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02.

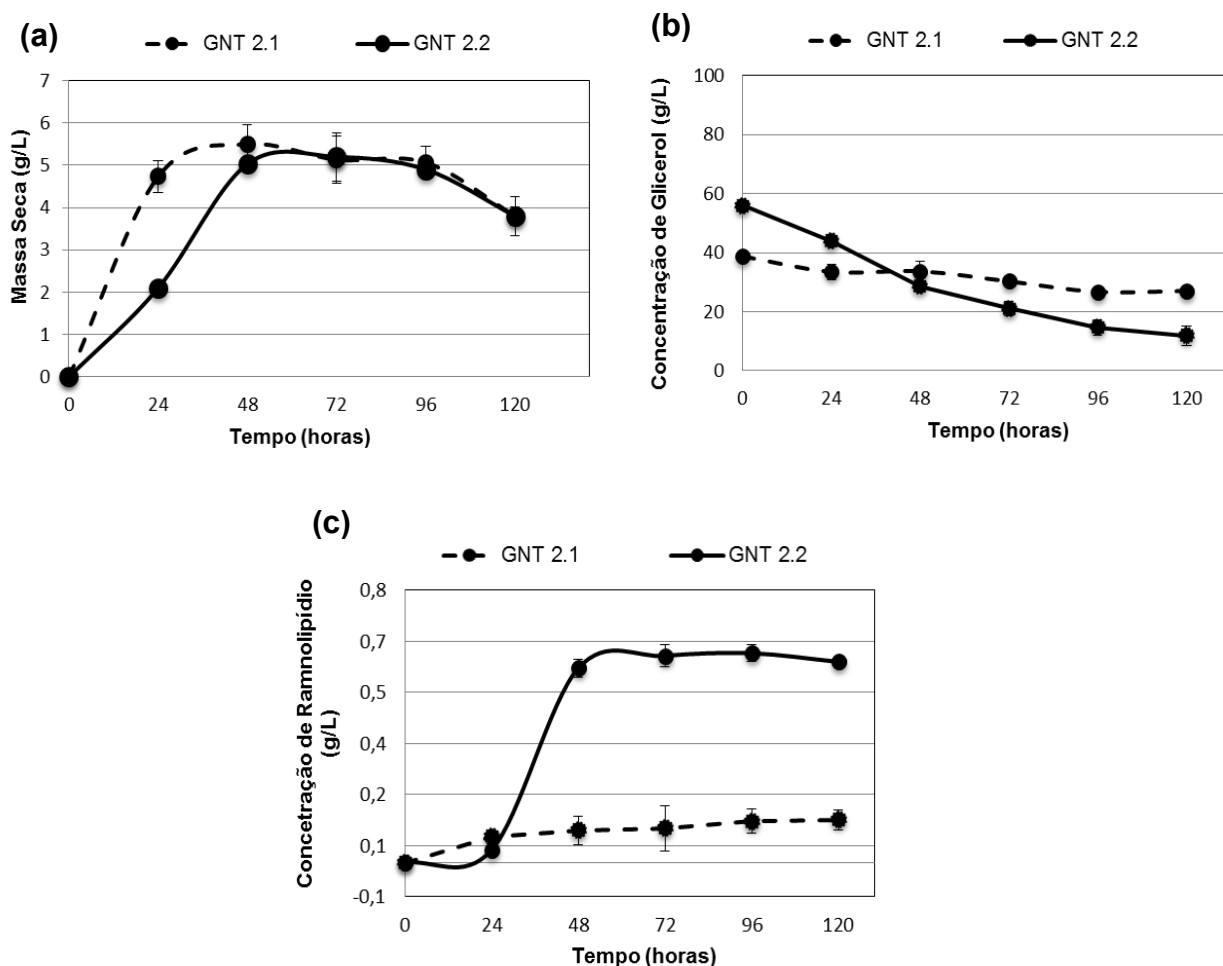
Resultados semelhantes aos obtidos com GNT 2.2 foram relatados por Santa Anna et al., (2002), que alcançaram concentração de 0.690 g/L de ramnolipídios ao cultivar *Pseudomonas aeruginosa* PA1 utilizando, como fonte de carbono, glicerol proveniente da indústria de Biodiesel.

Costa et al., (2005) investigaram o uso de substratos alternativos de baixo custo, dentre eles o glicerol proveniente da produção de biodiesel, para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) e ramnolipídios, por diferentes linhagens de



*Pseudomonas aeruginosa*. Quando a fonte de carbono foi glicerol, os autores relataram concentração de ramnolipídios variando entre 0,175 e 0,264 g/L, de acordo da linhagem cultivada. Tais valores apresentam aproximadamente 1/3 do alcançando com Glicerol Não Tratado 2.2 no presente estudo. Revelando o potencial desta fonte de carbono na produção do tensoativo.

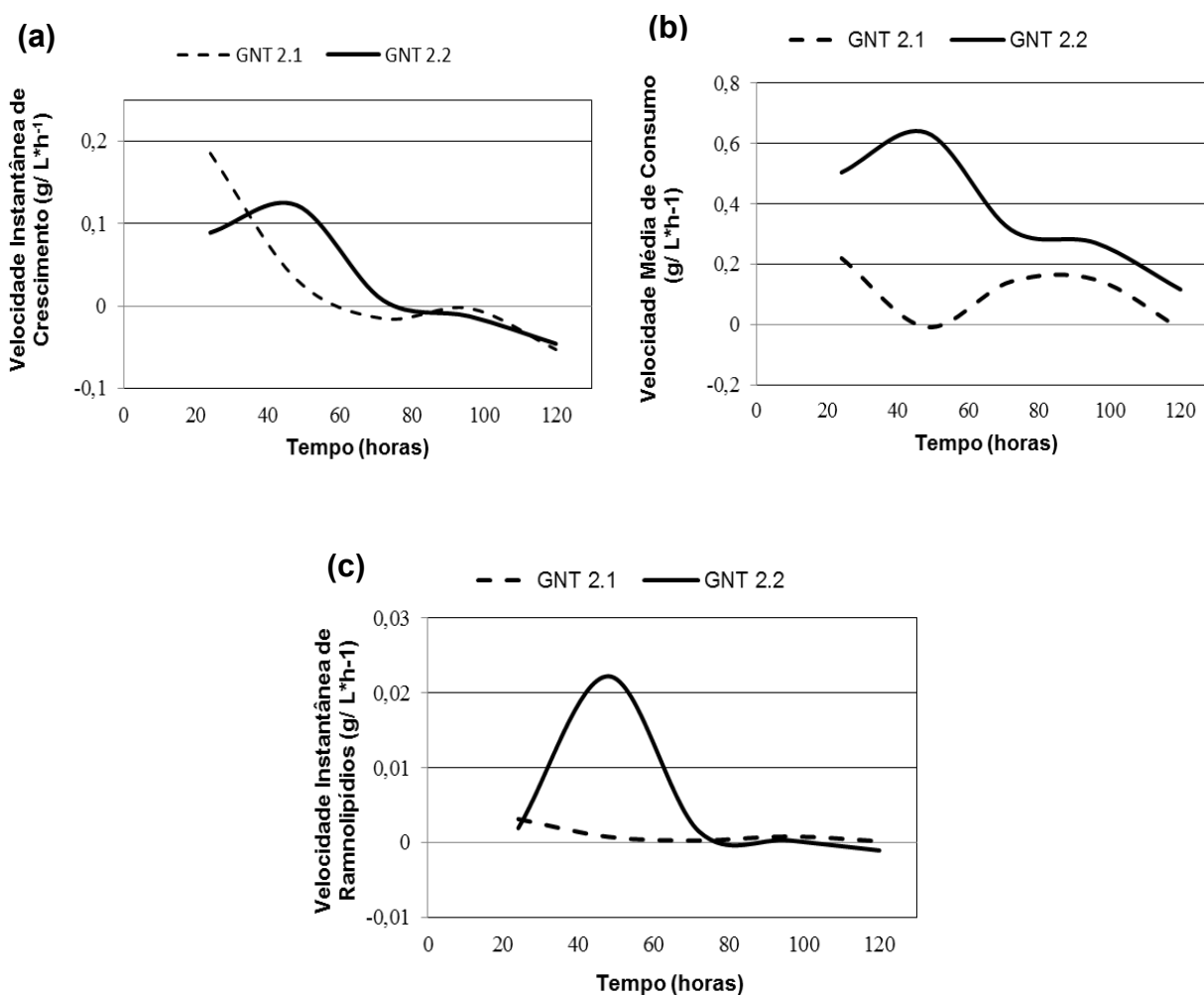
**Figura 8:** Perfil de crescimento (a), consumo de substrato (b) e produção de ramnolipídios (c) durante o cultivo em Frasco de *P. aeruginosa* LBI 2A1 ao utilizar como fonte de carbono Glicerol Não Tratado de Biodiesel, coletado em períodos distintos na empresa Biocapital.



A velocidade instantânea de crescimento foi maior para GNT 2.1 nas primeiras 24 horas. Após este tempo, a velocidade com GNT 2.2 supera a observada com GNT 2.1 e após 72 horas se assemelham até o final do cultivo (Fig. 9a). A velocidade instantânea de consumo de substrato foi maior para GNT 2.2

durante todo o experimento (Fig. 9b). A respeito da produção de ramnolipídios, a velocidade instantânea de produção, ao utilizar GNT 2.2 foi superior à exibida com GNT 2.1, apresentado seu pico em 48 horas de cultivo (Fig. 9c).

**Figura 9:** Velocidades instantâneas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto (a,b,c, respectivamente) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2AI, cultivada em Frasco com Glicerol Não Tratado, coletado em períodos distintos na empresa Biocapital.



Diante dos resultados, constata-se que *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI foi capaz de produzir ramnolipídios a partir de Glicerol Não Tratado, proveniente da produção de biodiesel, como fonte de carbono. Entretanto, houve diferença na metabolização dos resíduos (mesmo sendo coletados na mesma empresa e sem passar por tratamento), resultando em concentrações distintas do biossurfactante.

Segundo Chatzifragkou & Papanikolaou, (2012) a composição do glicerol coproduto da produção de biodiesel pode variar de acordo com a origem da matéria-prima utilizada para a produção do biodiesel, no método de transesterificação, na separação dos compostos formados, além do processo de tratamento do subproduto. Nesse sentido, como os resíduos provêm da mesma empresa, a diferença na produção do tensoativo pode estar na origem da matéria-prima utilizada na produção do Biodiesel. As diferentes composições inerentes de cada matéria-prima aplicada, provavelmente possibilitou a formação de glicerol com componentes variáveis, refletindo desse modo, na metabolização diferencial dos resíduos pelo micro-organismo.

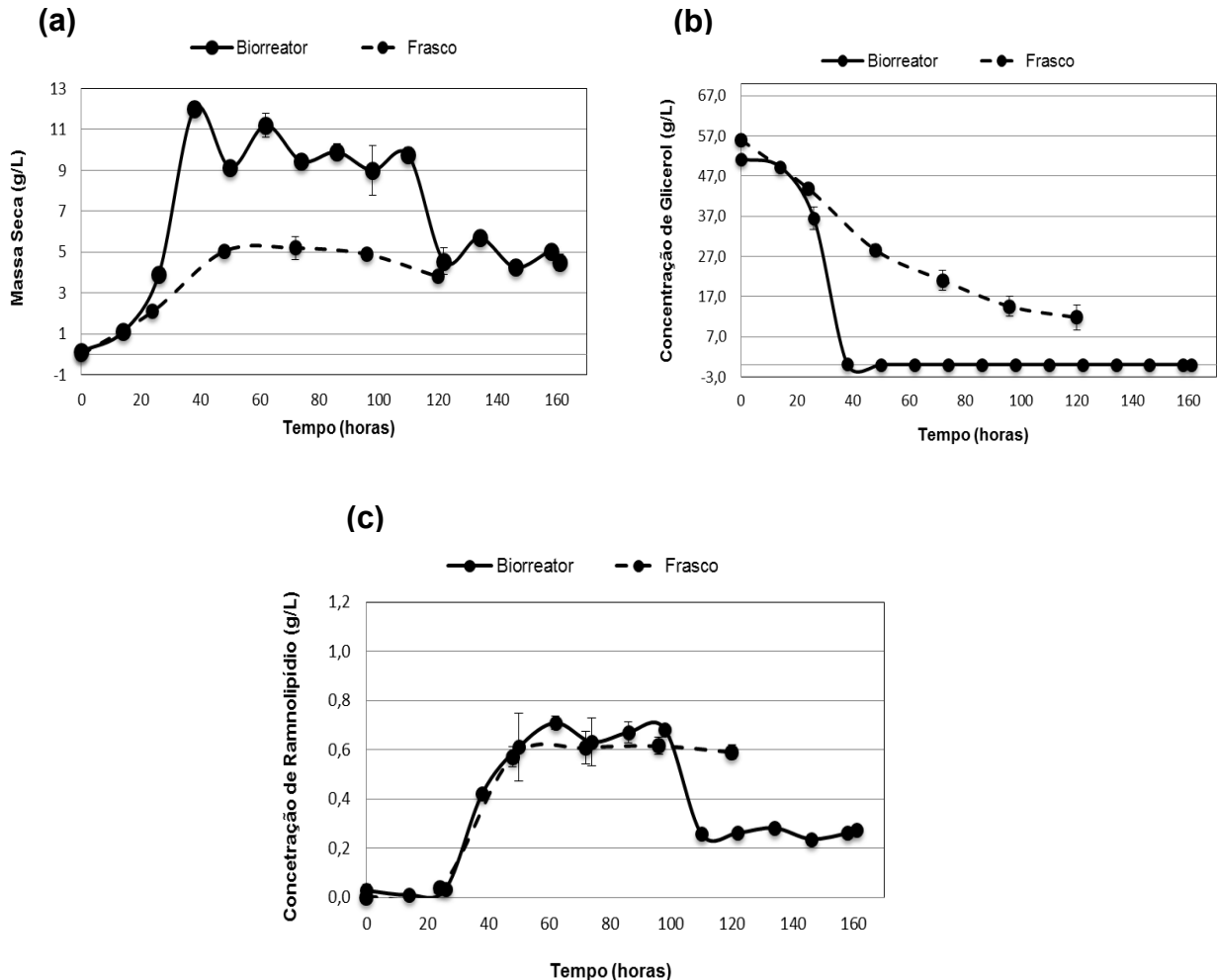
## **5.2 Experimentos conduzidos em Biorreator**

### *5.2.1 Glicerol Não Tratado 2.2 (GTN 2.2) conduzido em batelada simples*

A seguir serão descritos os resultados de crescimento, consumo da fonte de carbono e produção de ramnolipídios (Fig. 15 a, b, c; respectivamente) obtidos com a linhagem mutante *P. aeruginosa* LBI 2AI ao empregar como fonte de carbono Glicerol Não Tratado 2.2 nos cultivos em frascos e em biorreator, em batelada simples.

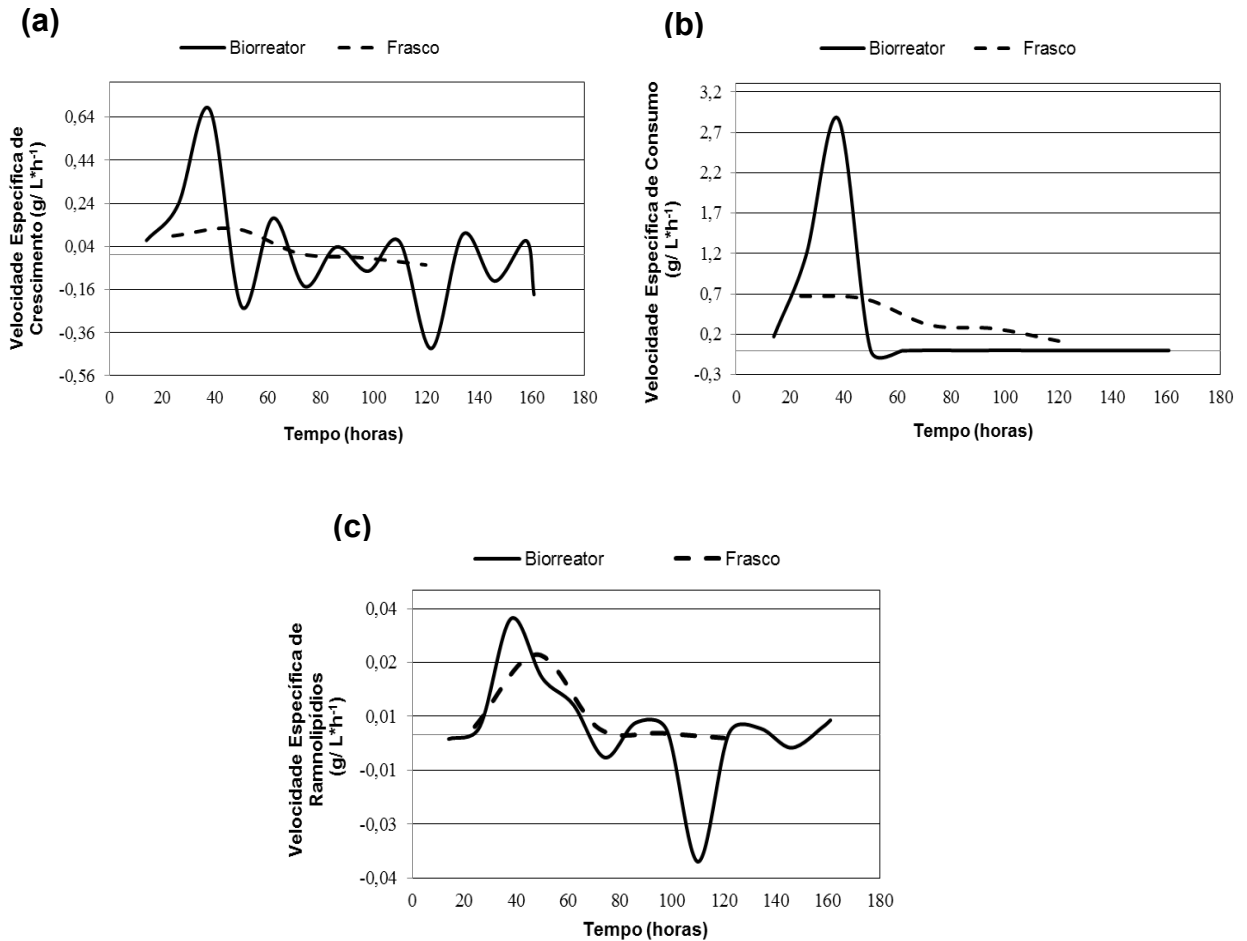
De acordo com a Figura 15a, o crescimento da biomassa em biorreator foi superior ao exibido em frasco. Em 38 horas de cultivo o consumo da fonte de carbono em biorreator foi cerca de 2 vezes superior ao exibido em frasco (Fig. 15b). Em relação à produção de ramnolipídios o perfil das curvas e a concentração do biossurfactante alcançados são semelhantes para os dois experimentos, até aproximadamente 96 horas; a partir desse tempo, a concentração do bioproduto no cultivo em biorreator passa a decair.

**Figura 15:** Perfil de crescimento (a), consumo de substrato (b) e produção de ramnolipídios (c) durante o cultivo de *P. aeruginosa* LBI 2AI ao utilizar Glicerol Não Tratado de Biocapital (2), como fonte de carbono, nos experimentos em Frasco e em Biorreator.



Observa-se na Figura 16, que até 38 horas de cultivo, momento em que a concentração da fonte de carbono praticamente chega a zero, as velocidades instantâneas de crescimento, consumo e produção de ramnolipídios via biorreator são superiores às alcançadas em frasco. Para a velocidade de produção do tensoativo, nota-se que em biorreator, nas primeiras 38 horas, é cerca de 2 vezes superior à apresentada em frasco. Após esse período, passa a decair e as curvas se assemelham até aproximadamente 96 horas (Fig.16c).

**Figura 16:** Velocidades instantâneas de crescimento (a), consumo de substrato (b) e formação de produto (c) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2AI, cultivada em Glicerol Não Tratado (2) Biocapital, em Biorreator e em Frasco.



Desse modo, os resultados podem indicar que os precursores dos ramnolipídios provavelmente foram produzidos na fase de crescimento e consumo de substrato. Com a redução da disponibilidade da fonte de carbono e a consequente desaceleração na velocidade produção, não houve aumento na produção de ramnolipídios em biorreator. Certamente houve a união dos precursores do tensoativo e a subsequente liberação. Pereira et al., (2013) observaram aumento de 41% na produção de ramnolipídios ao realizar processo em batelada alimentada, quando comparado com o bioprocessamento em batelada simples. Realizar o experimento com alimentação e com os parâmetros essenciais controlados seria uma alternativa para disponibilizar fonte de carbono ao micro-organismo a fim de ampliar a produção de ramnolipídios e, ao mesmo tempo, evitar o desequilíbrio osmótico ocasionado em condições de alta concentração de solutos, como glicerol.

### 5.2.2 Glicerol Não Tratado 2.2 conduzido em batelada alimentada

A seguir serão descritos os resultados de crescimento, consumo da fonte de carbono e produção de ramnolipídios, dos experimentos conduzidos em biorreator nos processos em batelada alimentada (1), com a aplicação de um pulso de alimentação, e em batelada alimentada (2), realizado com vários pulsos de alimentação. Os experimentos foram feitos com Glicerol Não Tratado 2.2 (GTN 2.2), como fonte de carbono, e comparados com os resultados obtidos em batelada simples (Fig. 17 a, b, c).

O perfil de crescimento microbiano nos cultivos em batelada alimentada (1) e (2) foram semelhantes até por volta de 30 horas de cultivo (Fig. 17a). Após este período o crescimento do micro-organismo no processo em batelada alimentada (1) passa a ser menor do que o apresentado nos outros dois processos. No período que se segue, a concentração de células no cultivo em batelada alimentada (1) foi cerca da metade da apresentada em batelada simples e batelada alimentada (2). Isso se deve, provavelmente, ao aumento acentuado da fonte de carbono em torno de 31 horas de cultivo, passando de 30g/L para 80g/L (Fig.17b). Certamente, o aumento em demasia da fonte de carbono afetou negativamente o crescimento microbiano e, sobretudo, a formação de produto (Fig. 17c). Observação semelhante foi feita por Lovaglio et al.,(2010) ao realizar cultivo em batelada alimentada com *Pseudomonas aeruginosa* LBI utilizando um resíduo industrial (borra de óleo), como fonte de carbono, para a produção de ramnolipídios. Os autores constataram que o excesso de fonte de carbono após a alimentação provocou efeito inibitório no metabolismo da bactéria, prejudicando consideravelmente a produção do biosurfactante.

O processo em batelada alimentada (2) foi conduzido em três pulsos (setas), como pode ser visto na Figura 17b. Os pulsos foram aplicados em 46, 66 e 75 horas de cultivo respectivamente. Estes, elevaram a concentração de glicerol no meio de cultivo para aproximadamente 17, 10 e 17 g/L, na devida ordem.

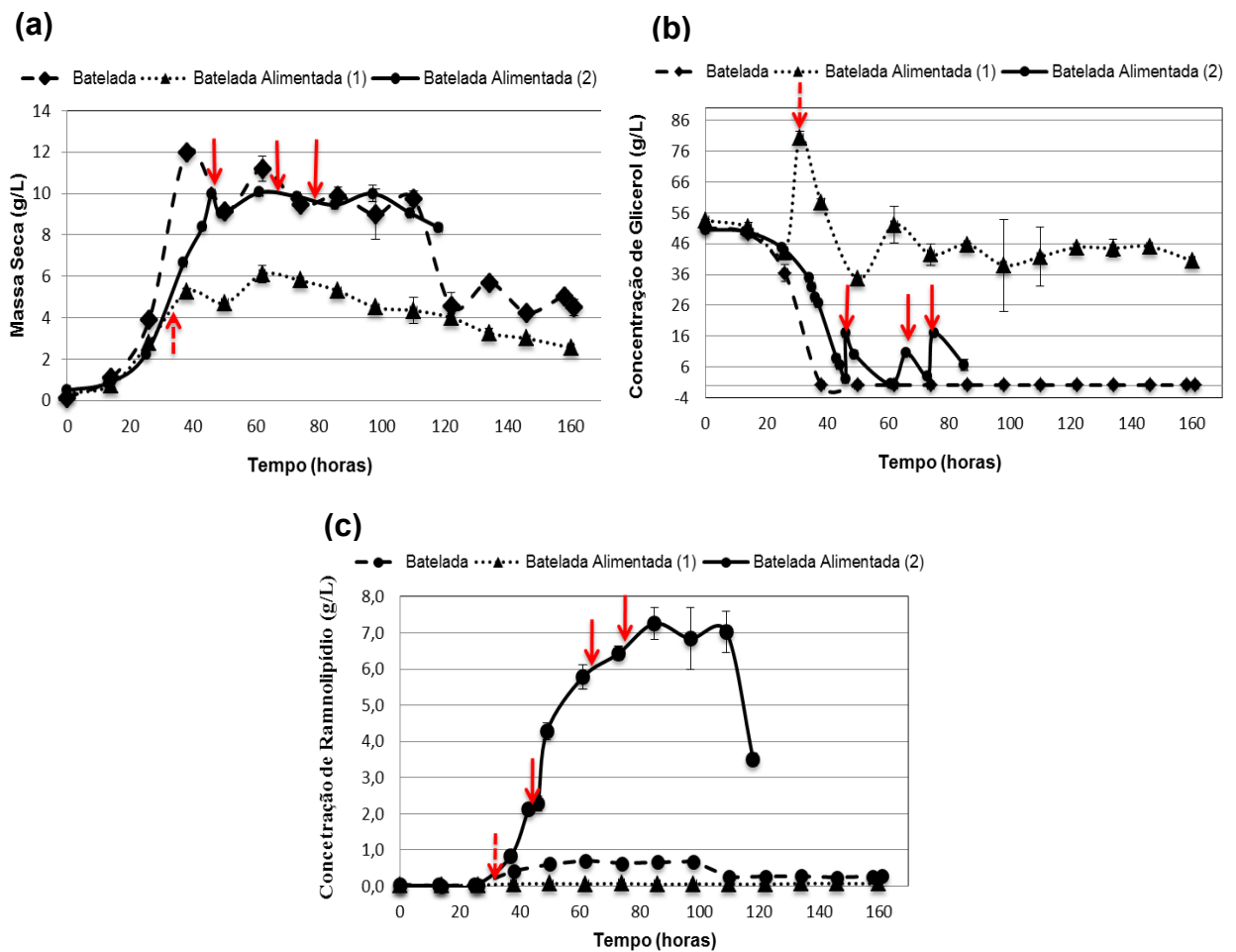
Cada pulso aplicado corresponde a aproximadamente 1/4 do volume da fonte de carbono utilizado no pulso em batelada alimentada (1). A utilização de menor volume de glicerol no pulso de alimentação, a realização dos pulsos quando a fonte de carbono foi inferior a 5g/L, além do reduzido aumento da concentração do meio,

após cada pulso, para cerca de 30% da concentração inicial (Fig. 17b) proporcionaram resultados positivos na produção de ramnolipídios (Fig.17c).

Após primeiro pulso do cultivo em batelada alimentada (2), observou-se a fase estacionária do crescimento microbiano (Fig. 17a). Além disso, os pulsos subsequentes não alteraram o perfil da biomassa, que foi semelhante ao observado em batelada simples.

**Figura 17:** Perfil de crescimento (a), consumo de substrato (b) e produção de ramnolipídios (c) durante o cultivo de *P. aeruginosa* LBI 2AI ao utilizar Glicerol Não Tratado 2.2 (GNT 2.2) como fonte de carbono, nos processos em batelada simples e batelada alimentada (1) e (2).

Setas: ↓ Pulso em batelada alimentada (1); ↓ Pulso em batelada alimentada (2)



Nota-se, que no período entre 46 e 85 horas de cultivo em batelada alimentada (2) o consumo de glicerol foi em grande parte direcionado para a

produção de ramnolipídios, já que a biomassa encontra-se na fase estacionária de crescimento e há elevada produção do biossurfactante (Fig. 17 a,b,c).

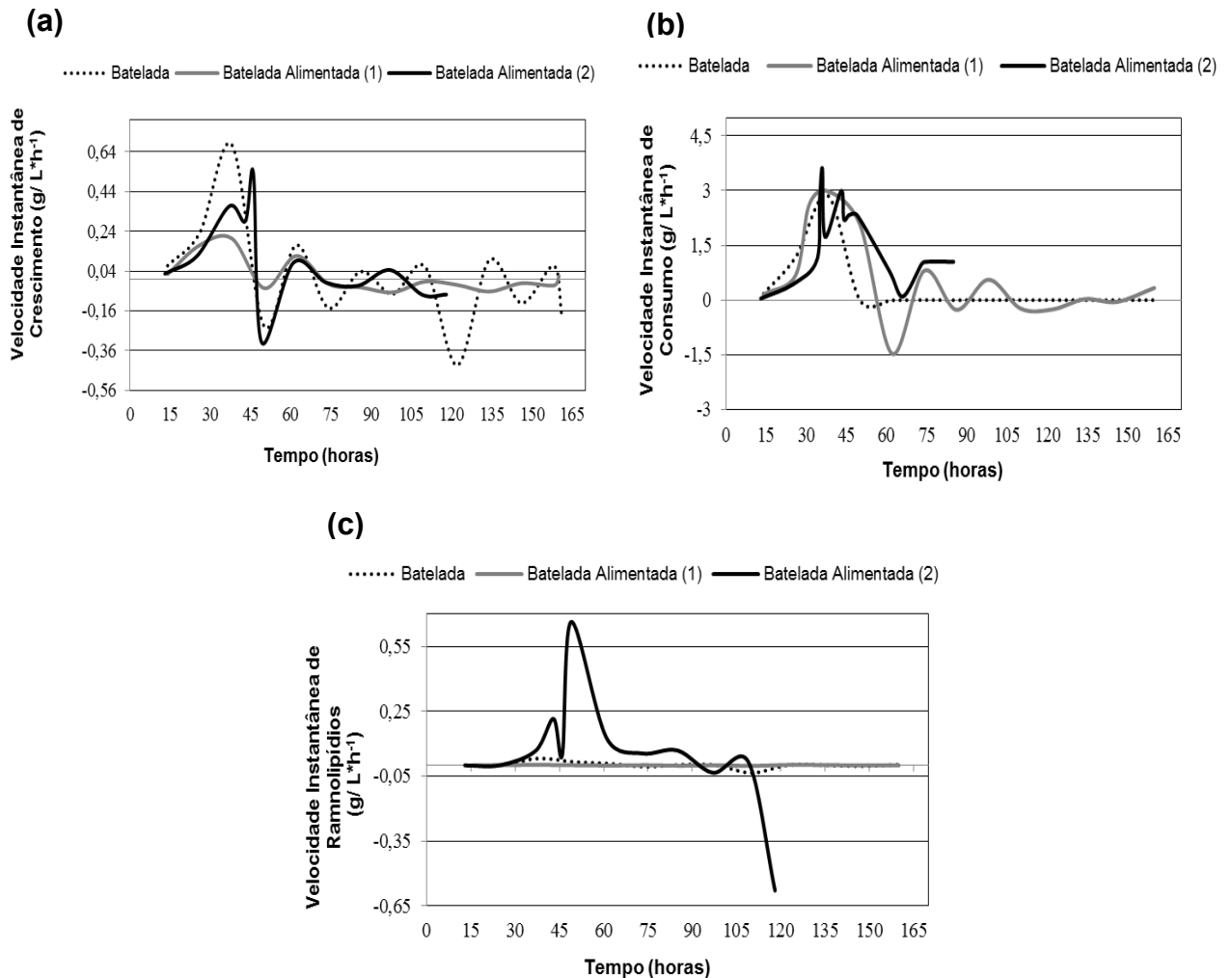
De acordo com a Fig. 17c, a produção de ramnolipídios foi baixa para todos os processos avaliados até aproximadamente 30 horas de cultivo. Em seguida, a produção do tensoativo em batelada alimentada (2) passa a aumentar expressivamente, alcançando concentração 145 e 11 vezes superior à alcançada no processo em batelada alimentada (1) e em batelada simples, respectivamente. A concentração máxima de ramnolipídios alcançada em batelada alimentada (2) foi de  $7,25 \pm 0,4$  g/L em 85 horas de cultivo. Tais resultados são promissores, uma vez que foi possível melhorar a produção de ramnolipídios em relação à batelada simples e à batelada alimentada (1).

A maior concentração do biossurfactante exibida em batelada alimentada (2) foi superior e obtida em menos tempo de cultivo que à relatada por Pereira et al., (2013). Os autores realizaram o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 a partir de glicerol bruto da produção de biodiesel, em biorreator com sistema de oxigenação não dispersiva, sem a formação de espuma. O processo realizado em batelada alimentada resultou em 3,88 g/L de ramnolipídios em 120 horas de cultivo; concentração cerca de 53 % inferior à alcançada no presente estudo e obtida em 35 horas a mais de cultivo.

Em relação à velocidade instantânea de crescimento observa-se que para os três processos, os picos de maior velocidade ocorreram entre o início e 46 horas de cultivo (Fig. 18b). Período este, que se observa maior crescimento microbiano e baixa produção de ramnolipídios (Fig. 17a, c). Nota-se que em batelada alimentada (1) o pico de velocidade instantânea de crescimento foi ao menos 2 vezes inferior aos observados nos outros processos.



**Figura 18:** Velocidades instantâneas de crescimento (a), consumo de substrato (b) e formação de produto (c) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2AI, cultivada em Glicerol Não Tratado 2.2 (GNT 2.2), como fontes de carbono, nos cultivos em batelada simples, batelada alimentada 1 (pulso de alimentação feito em 31 horas de cultivo) e batelada alimentada 2 (pulsos realizados em: 46, 66 e 75 horas de cultivo).



As velocidades de crescimento em batelada alimentada (2) e batelada simples foram similares após 46 horas de cultivo; apresentando-se baixas (inferiores à  $0,1 g/L \cdot h^{-1}$ ) até o final do experimento (Fig.18b).

Os picos das velocidades de consumo dos três processos avaliados ocorrem em aproximadamente 37 horas de cultivo apresentando valores próximos (Fig.18b). A velocidade de consumo em batelada simples se mantém por menos tempo que às alcançadas nos processos em que houve alimentação.

Em relação à velocidade instantânea de produção de ramnolipídios, o pico em batelada alimentada (2) foi expressivamente superior aos observados nos processos em batelada simples e em batelada alimentada (1); apresentando velocidade, cerca de 22 e 250 vezes superior, respectivamente (Fig. 18c).

Nota-se que 3 horas após o primeiro pulso, a velocidade de produção em batelada alimentada (2) atinge seu maior pico. Ao mesmo tempo, a velocidade de crescimento, logo após o primeiro pulso, passa a decair. Desse modo, constata-se que o consumo da fonte de carbono nesse período (Fig.17b) está em grande parte direcionado para a formação do biossurfactante.

A partir de 49 horas de cultivo a velocidade de produção (Fig. 18c) decai acentuadamente enquanto a velocidade de crescimento (Fig. 18 a) volta a valores positivos, apresentando, contudo, velocidade baixa (cerca de 15% do maior pico, às 61 horas de cultivo). Realizar um pulso em 49 horas de cultivo, momento em que ocorre o maior pico de velocidade e posterior decaimento, seria uma tentativa para elevar ou manter por mais tempo a velocidade máxima de produção, e alcançar maior concentração de ramnolipídios.

Após o segundo e terceiro pulso (66 e 75 horas, respectivamente) a velocidade de crescimento reduz sutilmente enquanto que a velocidade instantânea de produção, embora baixa ( $0,05 \text{ g/L.h}^{-1}$ ), é estabilizada por cerca de 20 horas. Isso ocorre até 85 horas de cultivo, momento em que a concentração de ramnolipídios (Fig. 17c) é máxima ( $7,2 \text{ g/L}$ ).

### 5.3 Fatores de conversão

Os rendimentos obtidos dos cultivos em frascos e biorreator em batelada simples e alimentada estão descritos na Tabela1. São apresentados rendimento biomassa/substrato ( $Y_x/s$ ), produto/substrato ( $Y_p/s$ ) e produto/biomassa ( $Y_p/x$ ), das seguintes fontes de carbono aplicadas: Glicerol Não Tratado 2.1 (GNT 2.1), Glicerol Não Tratado 2.2 (GNT 2.2), Glicerol Tratado 2 (GT2). Há que se ressaltar que em Batelada alimentada (2) são exibidos apenas os maiores rendimentos obtidos e suas respectivas etapas tomadas como referência no bioprocessos.

**Tabela 1:** Rendimentos dos cultivos de *P. aeruginosa* LBI 2AI, utilizando GNT 2.1, GNT 2.2 e GT2, como fontes de carbono nos processos em frascos e em biorreator

Parâmetro	Frasco			Biorreator				
	GNT 2.1	GNT 2.2	GT2	GTN 2.2				
				Batelada Simples	Batelada Alimentada (1)		Batelada Alimentada (2)	
				Valores	Etapa do Cultivo		Valores	Etapa do cultivo
				0-31 horas	Após o Pulso			
Yx/s	0,42	0,12	0,09	0,22	0,1419	0,0868	0,19	0 – 46 horas
Yp/s	0,01	0,02	0,02	0,01	0,0007	0,0008	0,24	46 – 66 horas (Entre o 1º e 2º pulso)
Yp/x	0,14	0,21	0,24	0,07	0,0051	0,0092	8,83	46 – 66 horas (Entre o 1º e 2º pulso)

Os fatores de conversão  $Y_{p/s}$  e  $Y_{p/x}$  em biorreator no processo em batelada simples ao utilizar GNT 2.2 foram inferiores aos alcançados em frascos. Em contrapartida, a eficiência na conversão de substrato em biomassa  $Y_{x/s}$  foi cerca de 2 vezes superior à observada em frasco. Há que se ressaltar que no experimento em frasco, houve disponibilidade da fonte de carbono durante todo o cultivo, chegando ao final com 11g/L em 120 horas (Fig.15b). Já em biorreator, o substrato praticamente foi esgotado em 38 horas, restando apenas 0,15g/L de um inicial de 51g/L. Reduzindo assim, o tempo e a quantidade de substrato disponíveis para a síntese de ramnolipídios.

Nos cultivos em frascos, comparando as fontes de carbono analisadas, se observa valores menores de  $Y_{p/s}$  e  $Y_{p/x}$  quando a eficiência de conversão de substrato em biomassa foi superior. O rendimento  $Y_{x/s}$  foi maior para GNT 2.1, apresentando valor cerca de 4 vezes superior aos demais substratos. Ao mesmo tempo, foi a fonte na qual apresentou os menores valores de rendimento  $Y_{p/s}$  e  $Y_{p/x}$ , nos cultivos em frascos.

Observa-se que no cultivo em batelada alimentada (1) os rendimentos foram baixos, apresentando maior eficiência na conversão de substrato a biomassa que produto. Após o pulso de alimentação (31 horas de cultivo) há sutil redução do rendimento biomassa/substrato, passando de 0,1419 para 0,0868. Já os fatores de conversão  $Y_{p/s}$  foram semelhantes antes e após o pulso.

De forma comparativa os maiores rendimentos ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{p/x}$ ) foram obtidos no processo em batelada alimentada (2) aplicando GTN 2.2.

Com relação ao cultivo em batelada alimentada (2), a eficiência na conversão de substrato em biomassa foi maior no início do cultivo (0 a 46 horas). Já os maiores rendimentos de produto por substrato ( $Y_{p/x}$ ) e de produção de ramnolipídios por biomassa ( $Y_{p/s}$ ) foram observados no período compreendido entre primeiro e segundo pulso de alimentação. Nota-se, que está incluído neste período o maior pico de velocidade instantânea de produção de ramnolipídios (Fig. 20c).

Se tratando da eficiência na conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ), a estratégia utilizada na alimentação com vários pulsos proporcionou maior rendimento  $Y_{p/s}$  em relação ao processo realizado com um pulso; o valor deste último correspondeu a 0,31% do obtido com vários pulsos. Lee et al., (2004) também observaram efeito positivo na aplicação de vários pulsos de alimentação com baixa

concentração da fonte de carbono. Os pesquisadores realizaram o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P em batelada simples e alimentada, aplicando óleo de peixe como fonte de carbono para a produção de ramnolipídios. Os autores relataram que ao realizar vários pulsos de alimentação com baixa concentração de fonte de carbono e sais foi possível aumentar a concentração de ramnolipídios obtida. De acordo com o estudo, os pulsos de alimentação com 2,5 g de óleo de peixe e 100 mL de sais proporcionaram um aumento de 1,2 vezes no crescimento microbiano e 1,3 vezes na produção de ramnolipídio, quando comparado com o cultivo em batelada simples.

No trabalho de Lee et al., (1999), relata-se o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80 em batelada alimentada aplicando uma fonte de carbono hidrofílica, glicose. Utilizando a estratégia de alimentação por pH stat, foi possível observar que os pontos de alimentação ocorreram quando havia 2 e 5g/L de glicose, respectivamente, no meio de cultivo. Além disso, a concentração da fonte de carbono foi elevada em 7 e 13g/L nos pontos de alimentação. Segundo os autores, foi possível obter concentração superior de ramnolipídio em relação à alcançada em batelada simples.

Li et al., (2010) realizaram o cultivo de *Pseudomonas* sp. M18G com inativação do gene *gacA* (gene que inibe a produção de feazina) em glicose, como fonte de carbono. Os cultivos foram feitos em batelada simples, alimentada com um pulso e alimentada com dois pulsos. O experimento no qual foi aplicado apenas um pulso elevou a concentração da fonte de carbono no meio em 6,6 g/L, correspondendo a 50% da concentração inicial. Já o cultivo conduzido com dois pulsos, a concentração de glicose do meio foi elevada em apenas 25 e 33%, respectivamente, em relação à concentração inicial. As estratégias de alimentação mostraram que a concentração de glicose adicionada após os pulsos de alimentação não prejudicaram o crescimento celular. Além disso, a aplicação de dois pulsos com baixa concentração da fonte de carbono possibilitou maior crescimento e produção do composto de interesse, em relação à batelada simples e alimentada com apenas um pulso.

A escolha de baixas concentrações da fonte de carbono nos pulsos de alimentação no presente estudo proporcionou resultados positivos que corroboram com o efeito das estratégias de alimentação e os resultados observados pelos

autores supracitados. Como relatado a partir dos gráficos comparativos (Fig. 17c), houve um aumento de 928% na produção de ramnolipídios, em relação ao processo em batelada simples.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI foi capaz de produzir ramnolipídios ao aplicar glicerol residual proveniente da produção de Biodiesel, como fonte de carbono. Foi possível otimizar a produção do biossurfactante, aplicando as estratégias de alimentação apresentadas neste estudo. Os cultivos em biorreator possibilitaram o aumento na concentração de produto formado, utilizando resíduos de Glicerol Tratado e Não Tratado, concentrações promissoras de ramnolipídios utilizando estes resíduos foram alcançadas 4,94 g/L e 7,2 g/L, respectivamente. Tais valores são 3,5 e 12 vezes superiores aos alcançados em frascos, na devida ordem. Vale ressaltar, que o cultivo utilizando Glicerol Não Tratado exibiu maior produção do biossurfactante em menos tempo de cultivo, quando comparado com o Glicerol Tratado, com uma diferença de 26 horas. Dessa forma, o uso desta fonte de carbono, em relação ao resíduo tratado, certamente possibilitaria a redução do tempo de cultivo e gastos com tratamento do resíduo. Além disso, constitui uma alternativa para o aproveitamento e valorização deste subproduto e uma estratégia para a redução dos custos de produção de ramnolipídios e da poluição ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, Washington, v.17, p. 1367-1371, 2001.
- ABDEL- MAWGOUD, A.M; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**,v. 86, p. 1323-36, 2010.
- ABIOVE. Associação Brasileira da Indústria de Óleos Vegetais. **Biodiesel: matérias-primas para produção**. São Paulo, Brasil; 2017.  
Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/>>. Acesso em: agosto de 2017.
- ARA, I.; MULLIGAN, C. N. Conversion of Cr(VI) in water and soil using rhamnolipid. 61. **St Canadian Geotechnical Conference**, Edmonton, Sept. 20-24, 2008.
- ARAUJO, L.V.; GUIMARAES, R. C.; MARQUITA, R. L. S.; SANTIAGO, V.M.J.; SOUZA, M.P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D.M.F. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v.63, p. 171-178, 2016.
- ASHBY, R.D.; NUÑEZ, A., SOLIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-production stream. **J Am Oil Chem Soc**, v. 82, p. 625–630, 2005.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.** Oxford, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **J. Food Eng.**, Essex, v.54, p.283-288, 2002.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Oxford, v. 50, p. 520-529, 1998.
- CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A. D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL- TAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene Encodes NADPH-dependent  $\beta$ -ketoacyl Reductase Which is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n. 17, p. 4442 – 4451, 1998.
- CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 95, p. 13–27, 2012.
- CHEE, J. Y.; TAN, Y.; SAMIAN, M. R.; SUDESH, K. Isolation and characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate 29 (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols. **J Polym Environ.**, v. 18, p. 584–592, 2010.
- CAVALHEIRO, J.M.B.T.; DE ALMEIDA M.C.M.D.; GRANDFILS, C.; DA FONSECA, M.M.R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochem.**, v. 44, p. 509-515, 2009.



COSTA, S.G.V.A.O; NITSCHKE, M.;HADDAD, R.; EBERLIN,M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBIrhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Proc. Biochem.Oxford**, v. 41, p. 483-488, 2005.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol.Rev.**, Salem, v.61, p.47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LEPINI, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiol.**, New York, v. 149, p. 2005 – 2013, 2003.

EAGON, R.G.; SIMMONS, G.P.; CARSON, K.J. Evidence for the presence of ash and divalent metals in the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. **Can. J. Microbiol**, v. 1, p.11041-1042, 1965.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnol.**, v.10, p.208-217, 1992.

GANESH, K.C.; MAMIDYALA, S.K.; DAS, B.; SRIDHAR B.; DEVI, G.S.; KARUNA, M.S. Synthesis of Biosurfactant-Based Silver Nanoparticles with Purified Rhamnolipids Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, p. 1061– 68, 2010.

GOSWAMI, D.; BORAH, S. N.; LAHKAR, J.; HANDIQUE, P.J.; DEKA,S. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. **J. Basic Microbiol.**, v. 55, p. 1 –10, 2015.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. And Environ. Microbiol.** Washington, v.48, n.2, p. 301-305, 1984.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J.A glyco-lipid by *Pseudomonas aeruginosa*.**J. Am. Chem. Soc.**, v.71, 4124-4126, 1949.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants, In:KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987.

LEUNG, D.Y.C; WU X.; Leung M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Appl Energy**, 87, 1083–1095, 2010.

LEE, Y.; LEE, S. Y.; YANG, J.W. Production of Rhamnolipid Biosurfactant by Fed-batch Culture of *Pseudomonas aeruginosa* Using Glucose as a Sole Carbon Source. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, p. 946-947, 1999.

LEE, K.M.; WANG, S.H.; HA, S. D.; JANG, J. H.; LIM, D.J.; KONG, J.Y. Rhamnolipid Production in Batch and Fed-batch Fermentation Using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.9. p.267-273, 2004.

LI, Y.; JIANG, H.; DU, X.; HUANG, X.; ZHANG, X.; XU, Y.; XU, Y. Enhancement of phenazine-1- carboxylic acid production using batch and fed-batch culture of *gac A* inactivated *Pseudomonas* sp. M18G. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3649-3656, 2010.

LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; LIMA, C.J. B.; CORTEZI, M.; CONTIERO, J. Effect of C/N Ratio and Physicochemical Conditions on the Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Research Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 19-24, 2010.

LOVAGLIO, R.B. Produção de rhamnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa*LBI [Tese]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista; 2011.

MARTINS, L. O.; BRITO, L. C.; SÁ-CORREIA, I. Roles of Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.12, p. 794-799, 1990.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 58, 428-434, 2002.

MU, Y, TENG, H, ZHANG, DJ, WANG, W, XIU, ZL. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.*, v.28, p. 1755-9, 2006.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 12, p. 199-210, 1989.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. Prog.**, New York, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Proc. Biochem.**, v. 46, p. 621-630, 2011.

OLVERA, C.; GOLDBERG, J. B.; SÁNCHEZ, R.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. **FEMS Microbiol. Letters**, Amsterdam, v. 179, p. 85-90, 1999..

PAGLIARO, M.; ROSSI, M. Glycerol: properties and production. In: PAGLIARO, M.; ROSSI, M. (eds) The future of glycerol, 2nd edn. **The Royal Society of Chemistry**, RCS, UK, p. 1–28, 2010.

PEREIRA, A. G.; PACHECO, G.J.; TAVARES, L.F.; NEVES, B.C.; KRONENBERGER, F. A.; REIS, R. R.; FREIRE, D.M.G. Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. **Process Biochemistry**, v.48, p.1271- 1278, 2013.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S.L.; RAO, H.S.P.; VIJJAPU, S. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* (VCRC B426). **Acta Tropica**, 2015.

PIRÔLLO, M.P.S; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 5, p. 1484 – 1490, 2008.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, p. 115-121, 2007.

ROBERTSON, B.D.; FROSCHE, M.; VAN PUTTEN, J.P. The identification of cryptic rhamnolipid biosynthesis genes in *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to lipopolysaccharide biosynthesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 6915-6920, 1994.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVEZ, T. L. M.; SANTOS, A.S.; Pereira Jr. N.; FREIRE, D.M.G.; Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n.2, p. 159– 166, 2002.

SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High Performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Chromatogr.**, v. 693, p. 7-13, 1995.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnol. Adv.**, v.27, p.30–39, 2009.

SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R.B.; VON ZUBEN, C.J.; CONTIERO, J.; Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*? **Front. Microbiol.**, v. 06, 2015.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnol.** Amsterdam, v. 22, n° 3, 142-146, 2004.

SOUSA, J.R.; COSTA CORREIA, J.A.; ALMEIDA, J.G.L.; RODRIGUES, S.; PESSOA, O.D.L.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochem**, v.46, p. 1831–1839, 2011.

STEPHANOPOULOS, G.N. ARISTIDOU, A.A.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering principles and Methodologies. San Diego: Academic Press, 725 p. 1998.

STEPHANOPOULOS, G.N.; VALLINI, J.J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. **Science**, v. 252, p. 1675-1681, 1991.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of Biosurfactants: In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 89-120, 1987

THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Biores. Technol.**, v. 98, p. 1149-1153, 2007.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl Eng Agric.**, v.22, p. 261-265, 2006.

VAN GERPEN, J. Biodiesel processing and production. **Fuel Process Technol.**, v. 86, p. 1097–1107, 2005.

WAGNER, V.E.; FILIATRAULT, M.J.; PICARDO, K.F.; IGLEWSKI, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and pathogenesis issues. In: CORNELIS, P. *Pseudomonas Genomics and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2008, p. 129 – 158.

WANG, S.; MULLIGAN, C. N. Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant. **Appl. Geochem.**, v.24, p. 935-938, 2009.

WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. **Microbiol.**, v.153, p.3923–3938, 2007.

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnol.**, v. 26, p.321–327, 2008.

YANG, X.; JIN, G.; GONG, Z.; SHEN, H.; BAI, F.; ZHAO, Z.K. Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloide* Y4 through the two-stage lipid production process. **Biochemical Engineer Journal.**, v.91, p.86-91, 2014.

ZHANG, Y.; ZHAO, Q.; JIANG, J.; WANG, K.; WEI, L.; DING, J.; YU, H. Accelation of organic removal and electricity generation from dewatered oily sludge in bioelectrochemical system by rhamnolipid addition. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 820-827, 2017.

ZHANG, Q.; JU, L.K. Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of  $\beta$ -glucosidase from cellulase enzyme mixture. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 48, p. 175–80, 2011.

ZHU, K.; ROCK, C.O. RhIA converts  $\beta$ -Hydroxyacyl-Acyl carrier protein Intermediates in fatty Acid synthesis to the  $\beta$ -Hydroxydecanoyl- $\beta$ -Hydroxydecanoate Component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. of Bacteriol.**, Washington, v. 190, n. 9, p. 3147 – 3154, 2008.

ZHONG, H.; JIANG, Y.; ZENGA, G.; LIUA, Z.; LIUA, L.; LIUA, Y.; YANG, X.; LAIA, M.; HEA, Y. Effect of low-concentration rhamnolipid on adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 on hydrophilic and hydrophobic surfaces. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 383-388, 2015.