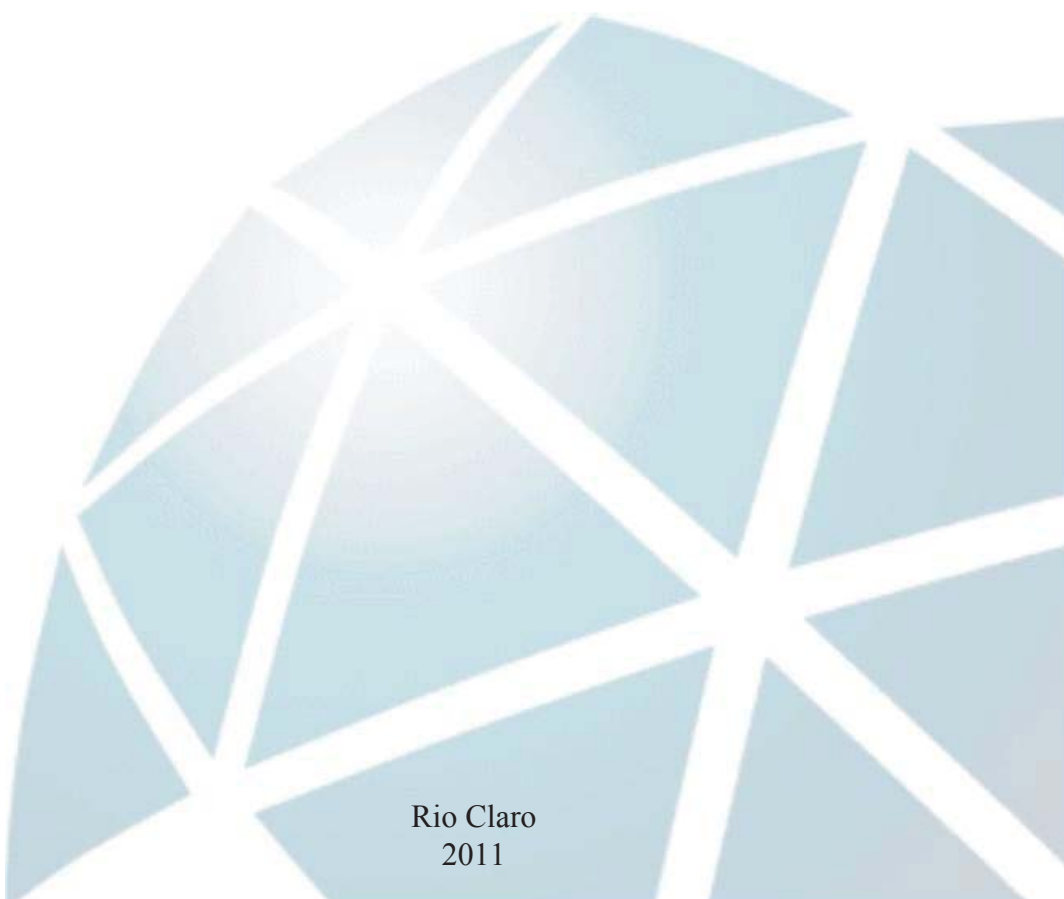

Ciências Biológicas

VINÍCIUS LUIZ DA SILVA

Estudo dos micronutrientes na produção de ramnolipídios por
mutante de *Pseudomonas aeruginosa* LBI



Rio Claro
2011

Vinícius Luiz da Silva

Estudo dos micronutrientes na produção de ramnolipídios
por mutante de *Pseudomonas aeruginosa* LBI

Orientador: Jonas Contiero

Co-orientador: 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 bacharel em Ciências
Biológicas

Rio Claro
2011

620.1122 Silva, Vinícius Luiz
S586e Estudo dos micronutrientes na produção de ramnolipídios por mutante
de pseudomonas aeruginosa LBI / Vinícius Luiz Silva. - Rio Claro : [s.n.],
2011
43 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas contiero
Co-Orientador: Roberta Barros Lovaglio

1. Biodegradação. 2. Biodeterioração. 3. Biosurfactante. 4.
Ranminolipídio. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

**Aos meus pais, Adevair Pereira da Silva e Sônia Eunice Luiz,
A quem devo toda minha educação, e formação Pai e Mãe amo vocês!
Nada me adiantaria o mundo na ausência do amor de vocês.**

"Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe."

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo gostaria de agradecer a Deus, força motora de todas as coisas, e bondade sublime, por não me deixar esmorecer, nem durante a execução desse trabalho nem frente a todos os percalços da vida, que ele continue a mostrar os caminhos, e me iluminar nas dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero, por me inspirar, servir de base proporcionando o que é necessário, para o meu crescimento profissional e pessoal e pelas suas frases marcantes que nos movem e nos inspiram.

A todos os colegas do laboratório de microbiologia industrial, obrigado pelos conselhos, conversas, dicas e por todas as técnicas que me ensinaram (Mariana, Lú, Mary, Paulo, Fabrício, Lorenzo, Natália, Marcela, Paula e Fran).

Gostaria de agradecer em especial os amigos e companheiros de laboratório, Batata, Paola e Kate, pelas conversas e pelo apoio, ao longo desses anos de laboratório.

E como não poderia deixar de ser gostaria de agradecer a minha co-orientadora Dra. Roberta Barros Lovaglio, por todos os ensinamentos e tempo despendidos para meu crescimento profissional, pelos puxões de orelha merecidos e proveitosos, Rô obrigado pela amizade pelas conversas, incentivo, e pelo exemplo de pessoa que você é.

A todo o pessoal do departamento de bioquímica e microbiologia, aos alunos, professores e técnicos.

Aos colegas de classe pela colaboração durante esses cinco anos, sem vocês tudo seria mais difícil, obrigado pelos resumos, cadernos emprestados, pelas risadas, pelos choros, por tudo mesmo.

Aos meus ex-companheiros de casa com quem muito aprendi com relação à vida, coisas das quais não poderia aprender em nenhum outro lugar (valeu Guma, Tião, Bigas, Carlinhos, Primo, Vêronica, Emo e Surdo), tivemos ótimos momentos e outros não tão bons assim, mas acredito que é assim que as pessoas se constroem.

A todos os meus familiares, primos, primas, tios e tias, avôs e avôs, tenho orgulho e imenso prazer em fazer parte dessa família, obrigado!!!

E principalmente aos meus pais Adevaire e Sônia, sem o apoio, compreensão e amor de vocês nada valeria a pena, esses foram cinco longos e difíceis anos longe de vocês, que não são apenas meus pais, são meus amigos, meus companheiros, confidentes e Heróis. Quantas vezes o colo me fez falta, quantas vezes o abraço estava distante, mais aos finais de semana vocês estavam lá com todo seu amor e apoio (Vocês são os pais mais maravilhosos do mundo).

A minha namorada por suportar as semanas distantes, e por estar sempre ao meu lado me servindo como suporte e inspiração, Camila obrigado pelo carinho e amor, te amo!!!

RESUMO

Os biossurfactantes apresentam inúmeras vantagens, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e alta estabilidade, mas não são amplamente utilizados devido ao custo de produção. A utilização de substratos baratos, linhagens mutantes que associados à otimização das condições de cultivo pode levar a uma redução nos custos, possibilitando assim a substituição dos surfactantes sintéticos pelos biológicos. Uma maneira empregada para maximizar a produção dos biossurfactantes é a limitação de nutrientes. Os esforços empregados nesse sentido são direcionado para as proporções carbono: nitrogênio, entretanto os efeitos dos elementos traços são pouco conhecidos. Devido a esses fatores, o presente trabalho avaliou a importância dos seguintes elementos traços: ferro, zinco, cobalto, cobre, manganês e do sal citrato de sódio dihidratado, nas fermentações realizadas utilizando o mutante de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1. Para tanto foram realizadas fermentações em frascos Erlenmeyer, onde se utilizou diferentes concentrações desses elementos. A influência dos mesmos na produção de ramnolipídios foi constatada, uma vez que a produção desse biotensioativo foi aumentada em mais de três vezes alterando apenas a concentração de um único elemento traço (Fe). Os experimentos realizados permitem, também, inferir a respeito das melhores concentrações desses micronutrientes para a produção de ramnolipídios.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1- Estruturas básicas dos ramnolipídios, RL1 e RL3, 2 moléculas de ramnose ligadas a 2 e 1 cadeia de ácidos graxos respectivamente , RL2 e RL4 1 molécula de ramnose ligada a 2 e 1 cadeias de ácidos graxos.....	13
Figura 2 - Produção de ramnolipídios (g/L) (A) e biomassa (g/L) (B) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de citrato.....	25
Figura 3- Variação na concentração dos homólogos Rhl1 e Rhl3 nas diferentes concentrações de citrato (A) sem citrato, (B) 25% de citrato, (C) 50% de citrato e (D) 75% de citrato.....	26
Figura 4- Via metabólica proposta para síntese de ramnose utilizando ácidos graxos como fonte de carbono.....	27
Figura 5- Produção de ramnolipídios (g/L) (A) e biomassa(g/L) (B), de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de ferro.....	28
Figura 6- Produção de ramnolipídios (g/L) (A) e biomassa(g/L) (B), de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de Cobalto.....	29
Figura 7- Produção de ramnolipídios (g/L) (A) e biomassa(g/L) (B), de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de Zinco.....	31
Figura 8- Produção de ramnolipídios (g/L) (A) e biomassa(g/L) (B), de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de cobre.....	32
Figura 9- Produção de ramnolipídios (g/L) (A) e biomassa(g/L) (B), de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de cobre.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

RL- Ramnolipídio

LC-MS- cromatografia líquida de alta resolução e espectrômetro de massa

MLCTF- Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato

D.O- Densidade ótica

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

C+ -Controle Positivo

Rhl1-Homólogo de ramnolipídio com uma ramnose

Rhl3-Homólogo de ramnolipídio com duas moléculas de ramnose

Ci- Citrato de Sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	14
2.1 Biosurfactantes	14
2.2 Classificação e estrutura dos biosurfactantes	14
2.3 Aplicações	17
2.4 Produção de biosurfactantes	17
2.5 Função dos Elementos traços para as células bacterianas	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.1.1 Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Micro-organismo.....	22
4.2 Meio de cultura	22
4.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF).....	22
4.2.2 Condições de cultivo	23
4.3 Métodos analíticos.....	24
4.3.1 Biomassa	24
4.3.2 Quantificação de ramnolipídio	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Citrato de Sódio	27
5.2 Ferro.....	29
5.3 Cobalto.....	31
5.4 Zinco.....	32
5.5 Cobre.....	33
5.6 Manganês.....	35
5.7 Melhores concentrações para cada micronutriente	36

6. CONCLUSÃO.....	37
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas que, devido à presença de regiões com polaridades distintas, apresentam propriedades como a capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial (MULLIGAN et al, 2005).

Dentro dessa classe molecular existem os surfactantes sintéticos derivados do petróleo e os biossurfactantes que são compostos biológicos produzidos por diversos seres-vivos. Os produtores de biossurfactantes mais bem estudados são micro-organismos tais como: fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BANAT et al, 2000; DESAI; BANAT, 1997). Esses biotensoativos possuem vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos, sendo as principais delas: a diversidade estrutural, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e estabilidade em condições de alta salinidade e amplas faixas de pH (BENINCASA et al, 2008; LOVAGLIO et al, 2011). Além disso, esses bioprodutos podem ser sintetizados utilizando substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, o que ajuda a reduzir o impacto ambiental e agrega valor a esses resíduos (RAHMAN et al, 2003; WEI et al, 2006; MARSUDI et al, 2008).

Apesar dessas vantagens os biossurfactantes não são utilizados em larga escala possuindo apenas uma pequena fração do mercado quando comparados aos surfactantes sintéticos. Isso se deve principalmente ao alto custo de produção, que está atrelado ao custo do substrato utilizado, baixa produtividade e dificuldade na recuperação do bioproduto (MÜLLER et al, 2010). Devido a esses fatores a otimização do meio de cultura, em conjunto com o desenvolvimento de linhagens mutantes ou recombinantes pode levar à substituição dos surfactantes sintéticos por aqueles de origem biológica (MUKHERJEE et al, 2006).

Diversos autores empregaram estratégias visando otimizar o meio de cultura para a produção de biossurfactantes, (FIECHTER, 1992; CHANG, 2005; GUERRA-SANTOS et al, 1984; RAZA et al, 2007; WU et al, 2007; MULLIGAN et al, 1989), porém um fator pouco avaliado, que pode contribuir para um aumento na produção de biossurfactantes, é a influência dos micronutrientes presentes no meio de cultura, essa influencia foi relatada por Lin et al, (1993), que verificaram que o boro possui um efeito negativo na produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis* e Wei et al, (2006) que demonstraram a importância do Mn para a produção de surfactina utilizando o micro-organismo *Bacillus subtilis*. Portanto o presente trabalho visa verificar a influencia dos elementos traços na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Biosurfactantes

Biosurfactantes são compostos de origem biológica produzidos por uma ampla gama de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. 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; MAKKAR, 1998).

A diferença de polaridade entre as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas dos biosurfactantes possibilitam a distribuição dessas moléculas na interface de dois compostos imiscíveis, conferindo aos biosurfactantes sua propriedade principal que é capacidade de redução das tensões superficial e interfacial. Estas propriedades os tornam adequados para serem utilizados em diferentes aplicações industriais tais como, detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT et al, 2000).

2.2 Classificação e estrutura dos biosurfactantes

Os surfactantes químicos são classificados de acordo com o grupo polar, já àqueles de origem biológica são classificados com base na sua natureza bioquímica. Dentre as principais classes de biosurfactantes estão os glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos, complexos de proteínas e polissacarídeos, lipossacarídeos, fosfolipídios, ácidos graxos associados a lipídios neutros e biosurfactantes poliméricos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os biosurfactantes podem também ser classificados de acordo com a sua massa molecular, havendo os de baixa massa molecular (glicolipídios, lipopeptídeos e fosfolipídios) e os de alta massa molecular (biosurfactantes poliméricos e particulados). A diferença na massa molecular confere diferentes propriedades a esses bioprodutos, de tal maneira que, os tensoativos de baixa massa apresentam maior atividade superficial, já os de alta massa exercem melhor atividade de emulsificação (ROSENBERG; RON, 1999).

De acordo com a revisão bibliográfica feita por Muthusamy et al, (2008) grande parte dos biossurfactantes conhecidos são glicolipídios, os quais são constituídos basicamente por cadeias de carboidratos unidos a ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos através de uma ligação éter ou éster, dentro desse grupo os biossurfactantes mais conhecidos são: soforolipídios, trealoselipídios e os ramnolipídios.

Os glicolipídios sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* são denominados ramnolipídios, a porção hidrofílica desses biossurfactantes é constituída por uma ou duas moléculas de ramnose (JARVIS et al 1949). A capacidade de produção de ramnolipídios por bactérias desse gênero foi primeiramente descrita por Jarvis et al (1949). Esses biotenssoativos podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m (ABALOS et al., 2001) e sua concentração micelar crítica está entre 5 - 200 mg/L (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* possuem quatro principais espécies de homólogos sendo elas, RL1 (Rha2C10C10), RL2 (RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) e RL4 (RhaC10) (LANG ; WAGNER, 1987), essas estruturas podem ser visualizadas na Fig 1.

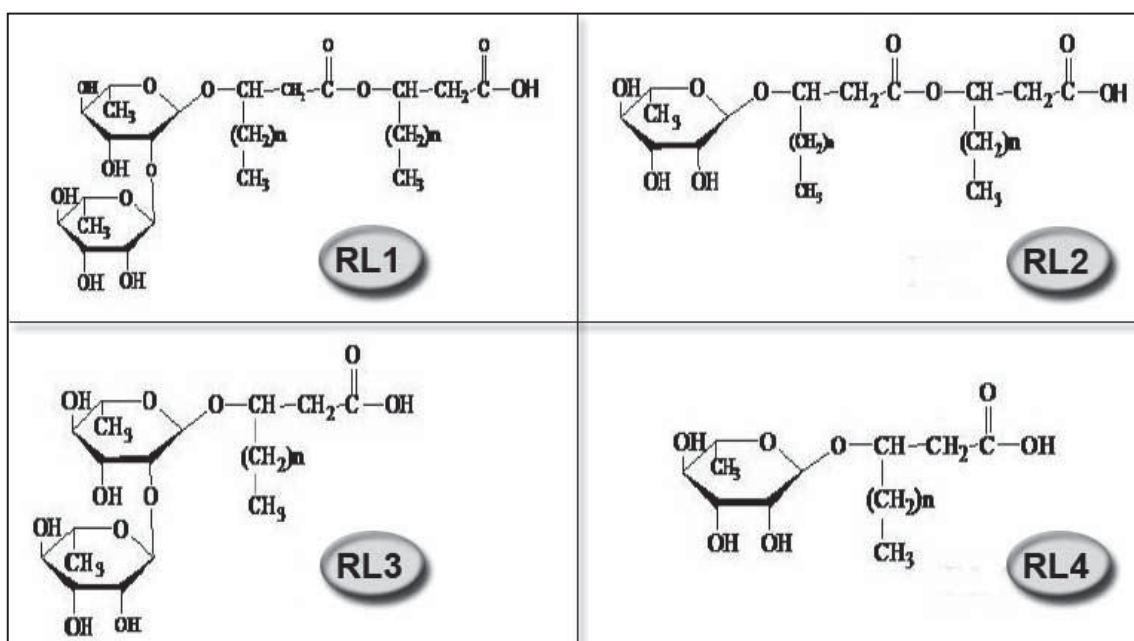


Figura 1: Estruturas básicas dos ramnolipídios, RL1 e RL3, 2 moléculas de ramnose ligadas a 2 e 1 cadeia de ácidos graxos respectivamente, RL2 e RL4 1 molécula de ramnose ligada a 2 e 1 cadeias de ácidos graxos respectivamente (LOVAGLIO, 2011).

Foram descritos 60 homólogos de ramnolipídios, os quais são produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* e de outras famílias (ABDEL-MAWGOUD et al, 2010). Eles diferem na composição e no grau de insaturação dos ácidos graxos (DEZIEL et al, 2000; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2005). A descoberta dessa grande variedade de homólogos esta

diretamente ligada ao fato de que novas tecnologias vêm sendo empregadas para a identificação dos ramnolipídios, tais como cromatografia líquida de alta resolução e espectrômetro de massa (LC-MS).

Há divergência na literatura quanto a predominância de homólogos de ramnolipídios, para alguns autores, os principais ramnolipídios secretados por *P. aeruginosa* são os mono-ramnolipídios (ARINO et al, 1996; SIM et al, 1997), porém existem relatos afirmando que a maioria dos ramnolipídios produzidos são di-ramnolipídios (DEZIEL et al, 2000, MATASANDOVAL et al, 2001; BENINCASA et al, 2004).

A composição e distribuição de homólogos em uma mistura de ramnolipídios são determinadas pela linhagem bacteriana, condições de cultivo e composição do meio de cultura. Já as propriedades do biossurfactante produzido dependem da quantidade e tipo de homólogos presentes (GUERRA SANTOS et al, 1984).

A estrutura anfipática dos biossurfactantes é constituída por uma porção hidrofóbica e uma região hidrofílica, em muitos casos a síntese dessas regiões deriva diretamente do metabolismo primário. As rotas para a síntese desses precursores são diversas e utilizam grupos específicos de enzimas, que em muitos casos, podem participar da síntese e também atuar como reguladores (DESAI ; BANAT, 1997). Segundo Sylatk e Wagner (1987), há quatro possibilidades para a síntese de biossurfactantes:

1. Porções hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas por duas rotas independentes;
2. A porção hidrofílica é sintetizada, enquanto a síntese da metade hidrofóbica é induzida pelo substrato;
3. A metade hidrofóbica é sintetizada e a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato;
4. A síntese de ambas, porções hidrofílicas e hidrofóbicas, é dependente do substrato.

A síntese de ramnolipídios por *Pseudomonas* está relacionada com a primeira possibilidade supracitada, ou seja, as partes hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas por rotas independentes. As condições de cultivo e a utilização de diferentes fontes de carbono influenciam na produção e composição do produto final, porém o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos utilizados como substratos, não exercem influência no comprimento da cadeia dos ácidos graxos dos glicolipídios (SYLDATK et al, 1985). Assim como a porção lipídica, o açúcar que compõe o ramnolipídio é formado por síntese *de novo*.

A produção desses biotensoativos por *Pseudomonas aeruginosa* é regulada por sistemas quorum-sensing, como os sistemas Las e Rhl (GAMBELLO et al, 1993; PEARSON et al, 1994). Inicialmente acreditava-se na existência de uma hierarquia rígida entre esses dois

sistemas, onde o sistema Las era considerado o regulador mestre; entretanto, Duan e Surette,(2007) e Dekimpe e Déziel, (2009) relataram que mesmo na ausência do sistema Las em algumas condições de cultivo específicas o sistema Rhl é ativo, regulando inclusive genes controlados pelo sistema Las, o que evidencia a complexidade do sistema que regula a biossíntese dos ramnolipídios, sendo esse o principal motivo da ampla variação na produção de ramnolipídios em diferentes condições nutricionais e ambientais.

2.3 Aplicações

Devido ao fato dos biossurfactantes serem moléculas anfipáticas de baixa toxicidade e ainda manterem suas propriedades em uma ampla faixa de pH e salinidade, eles possuem diversas aplicações na indústria, incluindo cosméticos, formulações farmacêuticas, indústria agrícola, alimentícia, recuperação de petróleo e biorremediação (KITAMOTO et al, 2002; SANDRIN et al, 2000; RAHMAN et al, 2003).

Os biossurfactantes possuem aplicações nas ciências biomédicas onde são usados como agentes antimicrobianos e antiaderentes (BENINCASA et al, 2004; ; KITAMOTO et al, 2002; HABA et al, 2002). De acordo com Thanomsub et al, (2007) um dos homólogos produzido por *Pseudomonas aeruginosa* B189 apresentou atividade inibitória frente as células do câncer de mama, além de serem eficientes como inseticidas.

Alguns ramnolipídios como Rha-Rha-C10-C10 e Rha-C10-C10, possuem um potencial algicida frente a algas nocivas (WANG et al, 2007).

Um grande potencial para a biorremediação de petróleo e derivados também é apresentada pelos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (SOBERÓN-CHAVEZ et al, 2005; BENINCASA, 2008; ZHU ; ZHANG, 2008).

2.4 Produção de biossurfactantes

Três estratégias têm sido adotadas para tornar o custo do processo de produção de ramnolipídios mais baixo, sendo elas:

- a) Matéria-prima de baixo custo, como resíduos industriais;
- b) O desenvolvimentos de bioprocessos eficientes para produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo;
- c) Desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante (MUKHERJEE et al, 2006).

Diversas dificuldades são encontradas durante o processo de produção de biotensoativos, pois vários parâmetros influenciam na concentração final desses bioprodutos. O tipo e a quantidade de produto formado são afetados pela natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e parâmetros físicos e químicos, como aeração, agitação, temperatura e pH (FIECHTER, 1992; CHANG, 2005).

Elevadas proporções C/N (GUERRA-SANTOS et al, 1984; RAZA et al, 2007; WU et al, 2007; LOVAGLIO et al, 2010) e C/P (MULLIGAN et al, 1989) estimulam a síntese de ramnolipídios, enquanto altas concentrações de cátions bivalentes, especialmente ferro, são inibitórias (GUERRA-SANTOS et al, 1986; VENKATA; RAMANA ; KARANTH, 1989). A utilização de NH_4^+ , glutamina, asparagina e arginina, como fonte de nitrogênio, inibem a produção de ramnolipídios, enquanto NO_3^- , glutamato e aspartato promovem a síntese (MULLIGAN ; GIBBS, 1989; VENKATA; RAMANA ; KARANTH, 1989; KÖHLER et al, 2000). O nitrato é relatado como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios, pois estimula a expressão do gene *rhlAB*, um dos principais responsáveis pela síntese desse bioproduto (VENKATA; RAMANA ; KARANTH, 1989; MANRESA et al, 1991 e ARINO et al, 1996). A preferência por essa fonte de nitrogênio pode estar relacionada ao fato de *P. aeruginosa* ser apta a fazer desnitrificação utilizando o nitrato como aceptor de elétrons (MANRESA et al, 1991). Fatores ambientais e condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio afetam a produção de biossurfactantes, pois interferem no crescimento e na atividade celular (DESAI e BANAT, 1997).

A produção de ramnolipídios por *Pseudomonas* sp. foi máxima quando o pH foi mantido entre 6 e 6,5; acima de 7 a produção cai bruscamente (GUERRA-SANTOS et al, 1984). A temperatura ótima de produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* 44T1 foi 37°C, de acordo com Robert et al (1989). A temperatura pode afetar também a composição do biossurfactante produzido por linhagens de *Pseudomonas* sp. A produção de biossurfactantes por leveduras teve um aumento quando as taxas de agitação e aeração foram elevadas (YEH et al, 2006). Sheppard e Cooper (1990) também verificaram a importância do oxigênio disponível no meio de cultura para a otimização e produção em grande escala de surfactina por *B. subtilis*.

A formação de espuma durante a produção de biossurfactante em biorreator é um dos grandes problemas enfrentados. Pois não se pode descartar o excesso de espuma, uma vez que nela há presença do biotensoativo de interesse, células e nutrientes. Nesses casos a interrupção da fermentação antes do período estabelecido, pode vir a ser necessária acarretando em um

menor rendimento. Na tentativa de diminuir a formação de espuma, Adamczak e Bednarski, (2000) adicionaram 4% de óleo de soja após 48 e 96 horas de cultivo, porém houve queda na produção de 45 para 28 g/L.

Além dos fatores supracitados, a influência dos elementos utilizados no meio de cultura é relevante para a produção de biossurfactantes. A produção desses bioprodutos por *Pseudomonas putida* é favorecida quando a quantidade de Fe^{3+} livre no meio é de 1000 ppm, enquanto que as concentrações mais favoráveis relatadas para o Na^+ e Ca^{2+} foram de 15 e 1 ppm, respectivamente (PRUTHI ; CAMEOTRA, 2003).

Pruthi e Cameotra (2003) constataram que o fósforo não exerce grande influencia na produção de biossurfactante por *P. putida* e que a concentração de Mg^+ exigida para a produção de ramnolipídio por esse micro-organismo é baixa. Em contra partida a importância do enxofre no meio de produção desses biossurfactantes é relevante, por favorecer a síntese do mesmo.

A produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis* é fortemente influenciada pelos seguintes elementos: fósforo, boro, cloro e sódio. Os compostos CaCl_2 e H_3PO_4 quando presentes no meio de cultura influenciam positivamente na produção de biossurfactante, já a utilização de H_3BO foi negativa para a síntese desse bioproduto (JOSHI et al, 2007). Outro elemento importante para a produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis* é o fosfato, se a concentração desse composto for aumentada em 50% no meio de cultura, a produção de biossurfactante triplica (LIN et al, 1993).

A produção de surfactina por *Bacillus subtilis* é afetada principalmente pela presença de K^+ ou Mg^{2+} , sendo que na ausência desses dois elementos há um decréscimo na produção desse biossurfactante (WEI et al, 2006). De acordo com Wei et al, (2003) os íons Fe^{2+} e Mn^{2+} também são importantes para a produção de surfactina, quando ambos estão ausentes, a produção do biossurfactante atinge um terço daquela obtida na presença desses íons. Já com a adição de um deles a produção aumenta para 80% da concentração alcançada na presença dos dois elementos citados acima (WEI et al, 2006).

Estudos conduzidos por Pruthi e Cameotra, (2003) também relatam a importância de otimizar as condições de cultivo para a produção de ramnolipídios por *Pseudomonas putida*. Nesse trabalho os autores deixam evidente a importância da fonte de carbono e de outros elementos minerais constituintes do meio de cultura para a produção desse biossurfactante tais como a concentração de nitrato, fósforo, enxofre e íons metálicos como ferro e magnésio.

2.5 Função dos Elementos traços para as células bacterianas

Diversos elementos traços são essenciais para o crescimento microbiano e o principal deles é o ferro. E esse elemento desempenha um importante papel na respiração celular durante o transporte de elétrons, pois é um componente essencial dos citocromos e outras proteínas (MADIGAN et al, 2010).

O Mn^{2+} pode substituir o Fe^{2+} na cadeia respiratória de alguns micro-organismos, porém a função celular primária do manganês é a de ativador enzimático (MADIGAN et al, 2010), atuando na ativação de enzimas málicas e no ciclo do ácido cítrico, onde é requerido como um ligante da isocitrato desidrogenase, que atua na oxidação do isocitrato, (KRISHNAN et al 2009). Os diferentes íons de manganês podem possuir diferentes funções; o Mn^{2+} pode ser fonte de energia para organismos mixotróficos, já a função dos elementos Mn^{3+} e o Mn^{4+} é a de acceptor final de elétrons na respiração anaeróbica (LIESKE, 1919; SARTORY ; MEYER., 1947). De acordo com Abdel-Mawgoud et al, (2008), esse metal traço pode estar ligado a produção de metabólitos secundários.

Outro elemento traço com importante função é o cobalto, que é um constituinte da vitamina B12, a qual participa da síntese das desoxirriboses, constituintes do DNA (MADIGAN et al, 2010). Além disso o Co é um constituinte da transcarboxilase em bactérias que metabolizam ácido propiônico (MADIGAN et al, 2010).

O Zn é um metal traço associado a replicação do material genético, sendo também um ligante da enzima DNA polimerase e de outras proteínas de ligação ao DNA (MADIGAN et al, 2010). Esse elemento traço influencia também na atividade de algumas enzimas, como fosfatases da bactéria *P. fluorescens* (POIRIER et al, 2008) que são enzimas ligadas à moléculas de alta energia, necessárias para a manutenção e crescimento celular.

O cobre, assim como a maioria dos metais, quando em alta concentração no meio de cultura, exerce efeito tóxico para as células, mas esse elemento é essencial para o crescimento e manutenção microbiana uma vez que está associado a enzimas relacionadas à respiração celular, como a peróxido dismutase e a citocromo oxidase (MADIGAN et al, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Verificar a influencia dos elementos traços na produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1.

3.1.1 Objetivos especificos

- Avaliar quais as melhores concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, Co, Cu, Mn e do sal citrato de sódio dihidratado, para a produção de ramnolipídios;
- Contribuir para uma otimização do meio de cultura utilizado para a produção desse bioproduto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado no presente trabalho foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, que estava acondicionada em tubos criogênicos a -20°C.

4.2 Meio de cultura

4.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF)

O meio de cultura utilizado nos experimentos possui a seguinte composição em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl- 0,1; NaNO_3 - 1,5; como fonte de carbono óleo de girassol- 125; tampão fosfato 0,1M pH 6,5 e 1 mL/L da solução contendo elementos traços e citrato de sódios. Para a elaboração do meio de cultura foi utilizada água deionizada, afim de evitar interferência de íons externos no meio de cultura.

4.2.1.1 Solução de elementos traços e citrato de sódio

A solução de elementos traços e citrato de sódio avaliada possui a seguinte constituição (g/L): citrato de sódio dihidratado – 2,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,28; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,4; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,8. As variações nas concentrações de cada elemento (25, 50 e 75%) é em relação à solução descrita acima.

A fim de avaliar a importância dos elementos contidos nessa solução variou-se a concentração de cada elemento de acordo com a tabela 1:

Tabela1: Concentração de cada elemento traço e do citrato de sódio em cada condição de cultivo

	citrato de sódio 2H₂O	FeCl₃ 6H₂O	ZnSO₄ 7H₂O	CoCl₂ 6H₂O	CuSO₄ 5H₂O	MnSO₄ H₂O
Controle	2,00	0,28	1,40	1,20	1,20	0,80
Controle negativo						
Citrato	0,00	0,28	1,40	1,20	1,20	0,80
Fe	2,00	0,00	1,40	1,20	1,20	0,80
Zn	2,00	0,28	0,00	1,20	1,20	0,80
Co	2,00	0,28	1,40	0,00	1,20	0,80
Cu	2,00	0,28	1,40	1,20	0,00	0,80
Mn	2,00	0,28	1,40	1,20	1,20	0,00
25%						
Citrato	0,50	0,28	1,40	1,20	1,20	0,80
Fe	2,00	0,07	1,40	1,20	1,20	0,80
Zn	2,00	0,28	0,35	1,20	1,20	0,80
Co	2,00	0,28	1,40	0,30	1,20	0,80
Cu	2,00	0,28	1,40	1,20	0,30	0,80
Mn	2,00	0,28	1,40	1,20	1,20	0,20
50%						
Citrato	1,00	0,28	1,40	1,20	1,20	0,80
Fe	2,00	0,14	1,40	1,20	1,20	0,80
Zn	2,00	0,28	0,70	1,20	1,20	0,80
Co	2,00	0,28	1,40	0,60	1,20	0,80
Cu	2,00	0,28	1,40	1,20	0,60	0,80
Mn	2,00	0,28	1,40	1,20	1,20	0,40
75%						
Citrato	1,50	0,28	1,40	1,20	1,20	0,80
Fe	2,00	0,21	1,40	1,20	1,20	0,80
Zn	2,00	0,28	1,05	1,20	1,20	0,80
Co	2,00	0,28	1,40	0,90	1,20	0,80
Cu	2,00	0,28	1,40	1,20	0,90	0,80
Mn	2,00	0,28	1,40	1,20	1,20	0,60

4.2.2 Condições de cultivo

4.2.2.1 Inóculo

O pré-inóculo foi preparado a partir dos tubos de cultura estoque, onde 100 µL de cada mutante foi adicionado a Erlenmeyers contendo 25 mL de caldo nutriente, em seguida os

mesmos foram incubados durante 24 horas, a 37°C e 200 rpm. Após este período, 1, 25 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos contendo 50 mL de meio mineral livre de cálcio e óleo de girassol como fonte de carbono. Em seguida, 1 mL do cultivo foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1mL de solução salina de NaCl 0,85% (p/v). Esse material foi novamente centrifugado afim de lavar as células e retirar possíveis resíduos da fonte de carbono. Após essa etapa, descartou-se novamente o sobrenadante, e as células foram ressuspensas no mesmo volume de salina, realizou-se a leitura de absorvância a $\lambda = 580\text{nm}$ (Espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC). A quantidade de pré-inóculo a ser transferido para os frascos de fermentação foi determinada através da formula $C1 \times V1 = C2 \times V2$ onde $C1$ = valor da absorvância; $V1$ = volume a ser inoculado do pré-inóculo $C2 = 2\%$ do volume a ser utilizado na fermentação e $V2$ = a quantidade de meio no frasco, de maneira que a D.O inicial do experimento fosse igual a 0,1.

4.2.2.2 Condições de cultivo

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 300 mL contendo 50 mL do meio mineral livre de cálcio sob agitação de 200 rpm a 37°C pelo período de 96 horas.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Biomassa

As amostras foram retiradas a cada 24 horas e a biomassa quantificada através de massa seca. O volume de amostra retirado era de 1,4 mL, que foi centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm para separar as células; o sobrenadante foi guardado para quantificação de ramnolipídio, as células foram re-suspensas em igual volume de solução salina e novamente centrifugadas, para que ocorresse a lavagem das mesmas, retirando o excesso de fonte de carbono. Após esse processo, as células foram colocadas em frascos previamente pesados e submetidas a secagem em estufa à 65°C por 24 horas. Os frascos contendo biomassa foram então novamente pesados e a massa seca quantificada pela diferença entre o peso inicial e final.

4.3.2 Quantificação de ramnolipídio

Para o processamento das amostras, retirou-se um volume de 600 μL do sobrenadante anteriormente armazenado (item 4.3.1), o qual foi então misturado a 600 μL de n-hexano e

agitado vigorosamente por 1 minuto a fim de retirar o óleo residual da amostra. Após centrifugação por 30 minutos à 4000 rpm e 4°C, ocorreu a formação de duas fases (fase oleosa/fase aquosa), sendo retirados 550 µL da fase inferior (fase aquosa). À qual foi adicionado 1% de ácido fosfórico 85%. A mistura foi novamente agitada por 1 minuto, em seguida adicionou-se 1,25% (v/v) de acetato de etila, seguindo-se nova agitação por 1 minuto, e posteriormente centrifugada por 10 min a 10000 rpm e 4°C, a fase de cima foi retirada e armazenada, e a fase inferior foi novamente submetida à extração com acetato de etila.

4.3.2.1 Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar se houve produção de ramnolipídios antes de prosseguir com análises em HPLC. Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte mistura: clorofórmio / metanol / ácido acético (65:15:2). O agente revelador utilizado foi a seguinte mistura 2 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético, acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico. As amostras consistiram em 10 µL de extratos de ramnolipídios obtidos, a partir do caldo livre de células, em diferentes tempos de fermentação, além dos padrões de ramnolipídios obtidos da Jeneil Biosurfactant Company, USA.

4.3.2.2 Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC

4.3.2.2.1 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 µL de acetonitrila e 40 µL 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 termomixer (*Thermomixer* comfort, Eppendorf AG). 87

4.3.2.2.1.1 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 (Supelcosil LC18, Supelco - 150 mm x 4.6 mm, 5 µm silica 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 solução 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 21,5 +/- 0,1 min pra Rha-Rha-C10C10 22,2 +/- 0,1 min para Rha-C10C10.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos, onde se avaliou a influência dos elementos traços e do citrato no crescimento e produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1. Como grupo controle, utilizou-se o meio de cultura completo, ou seja, meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato mais a solução contendo todos os elementos (sigla C+).

5.1 Citrato de Sódio

Os resultados obtidos através da variação na concentração de citrato de sódio no meio de cultura estão apresentados na figura 2.

A máxima concentração celular foi obtida pelo grupo controle, esse resultado era esperado, uma vez que os elementos traços são essenciais para o crescimento e manutenção celular microbiana (Fig. 2A). O citrato participa do ciclo do ácido cítrico, que esta diretamente relacionado à obtenção de energia (NELSON; COX, 2006).

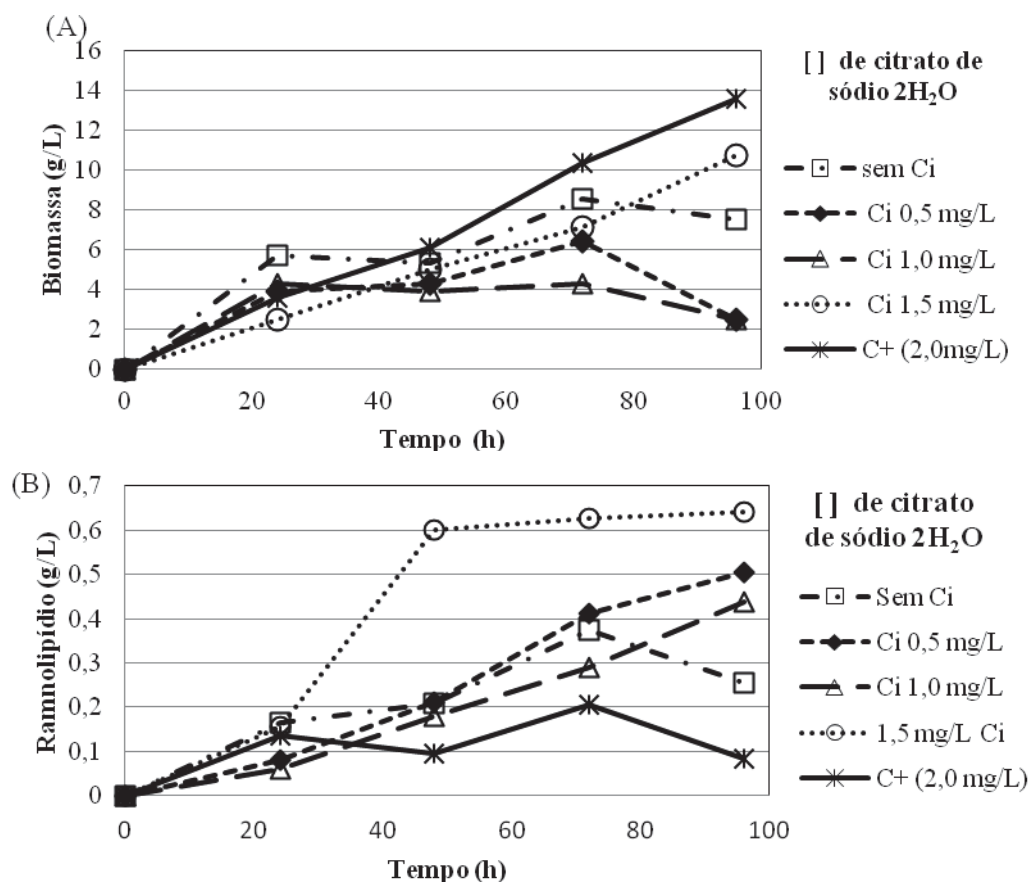


Figura 2: Biomassa (g/L) (A) e Produção de ramnolipídios (g/L) (B) de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de citrato.

A quantidade de citrato de sódio no meio de cultura influenciou a produção de ramnolipídios, a maior concentração desse biotensoativo foi alcançada quando a concentração de citrato foi 1,5mg/L, nessas condições obteve-se 0,64 g/L de bioproduto, como pode ser observado na Fig. 2 B.

Como apresentado no material e métodos o presente trabalho quantifica dois diferentes homólogos de ramnolipídios (Rh11 e Rh13) e a soma das concentrações desse homólogos, nos da a concentração final desse bioproduto. A figura abaixo mostra as concentrações de cada um dos homólogos de ramnolipídios (Rh11 = 1 molécula de ramnose e dois ácidos graxos e Rh13 = 2 moléculas de ramnose e dois ácidos graxos) produzidos nas diferentes concentrações de citrato (Fig. 3).

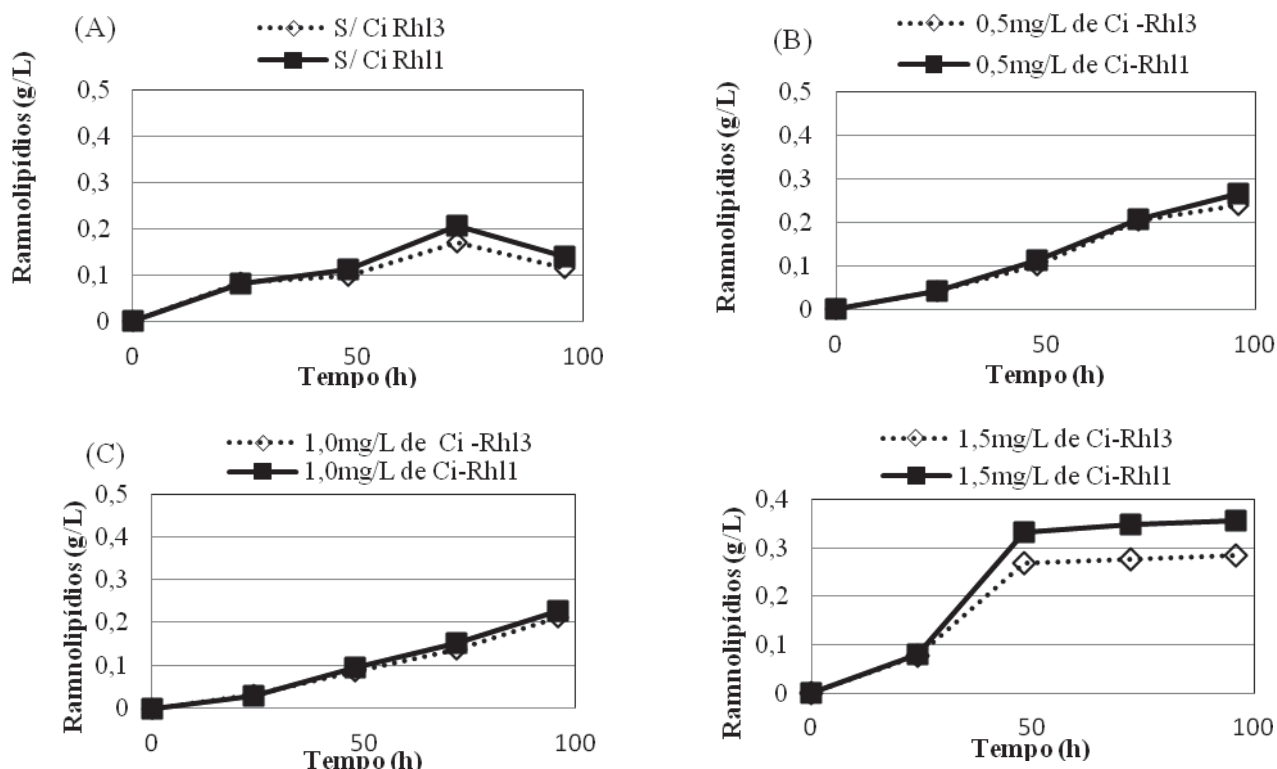


Figura 3: Variação na concentração dos homólogos Rh11 e Rh13 nas diferentes concentrações de citrato (A) sem citrato, (B) 25% de citrato, (C) 50% de citrato e (D) 75% de citrato.

A figura 3 demonstra que a concentração do homólogo Rh13 aumenta com a adição de citrato, atingindo 0,28 g/L, quando a concentração desse sal é 1,5 mg/L. Esse homólogo possui em sua constituição duas moléculas de ramnose, portanto acredita-se que o aumento na produção desse ramnolipídio possa estar ligado a um favorecimento na síntese do açúcar que o compõe, o que faz sentido, pois o citrato é um dos constituintes do ciclo do Glioxilato e do ciclo do ácido cítrico.

Quando a fonte de carbono utilizada no meio de cultura é uma fonte hidrofóbica como a utilizada no presente trabalho (óleo de girassol) propõem-se que a região hidrofílica dos ramnolipídios seja produzida da seguinte maneira: a partir da β -oxidação dos ácidos graxos há produção de acetil-CoA, essa molécula entra no ciclo do glioxilato, onde ele é transformado em succinato, que é direcionado então para o ciclo do ácido cítrico, sendo convertido a oxalacetato, que é um precursor da gliconeogênese, onde passa por uma serie de reações que culminam na glicose 6-fosfato, que é convertida a dTDP-L-ramnose (LOVAGLIO, 2011), como descrito na figura 4.

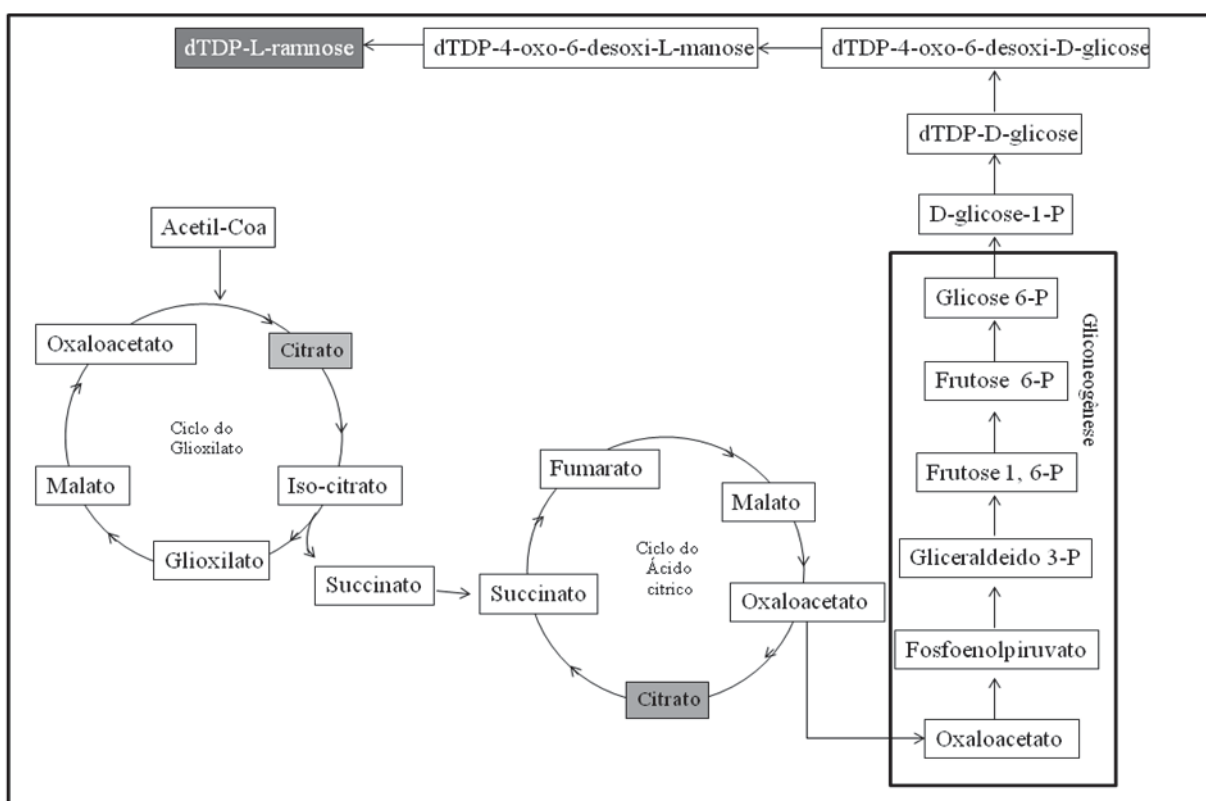


Figura 4: Via metabólica proposta para síntese de ramnose utilizando ácidos graxos como fonte de carbono.

As concentrações de cada elemento descritas nas figuras de 5 a 9, referem-se ao metais livres, ou seja, não considera-se a concentração do sal que contem o mesmo.

5.2 Ferro

O grupo experimental em que se avaliou a variação na concentração de ferro no meio de cultura será mostrado na figura 5.

Novamente, o aumento da biomassa microbiana foi maior no grupo controle de experimentos e a segunda melhor condição para o crescimento foi com a concentração de

ferro, equivalente a $0,043\mu\text{g/L}$. Sabe-se que o ferro exerce papel fundamental na respiração celular (MADIGAN et al, 2010), que é essencial para obtenção de energia pelas células, a qual é necessária para a manutenção e crescimento do micro-organismo, por esse motivo uma concentração de ferro inferior a $0,043\mu\text{g/L}$ resulta em queda no crescimento microbiano (Fig. 5 A).

A melhor concentração de ferro para a produção de ramnolipídios foi $0,043\mu\text{g/L}$, o que levou a um acréscimo na produção de três vezes e meia, atingindo $0,73\text{ g/L}$ de ramnolipídios, quando comparada à máxima produção obtida pelo controle ($0,2\text{ g/L}$), a segunda maior produção se deu na concentração de $0,029\mu\text{g/L}$ de Fe, o que sugere que a concentração ótima de ferro para a produção de ramnolipídios está entre $0,029\mu\text{g/L}$ e $0,043\mu\text{g/L}$. Há relatos na literatura de que a produção de ramnolipídios é favorecida quando há limitação de ferro no meio de cultura, (DÉZIEL et al., 2003; GLICK et al., 2010), isso pode estar relacionado ao fato de que este elemento interfere no quorum sensing em *P. aeruginosa* diminuindo a expressão dos genes controlados pelo sistema LasR (DUAN ; SURETTE., 2007).

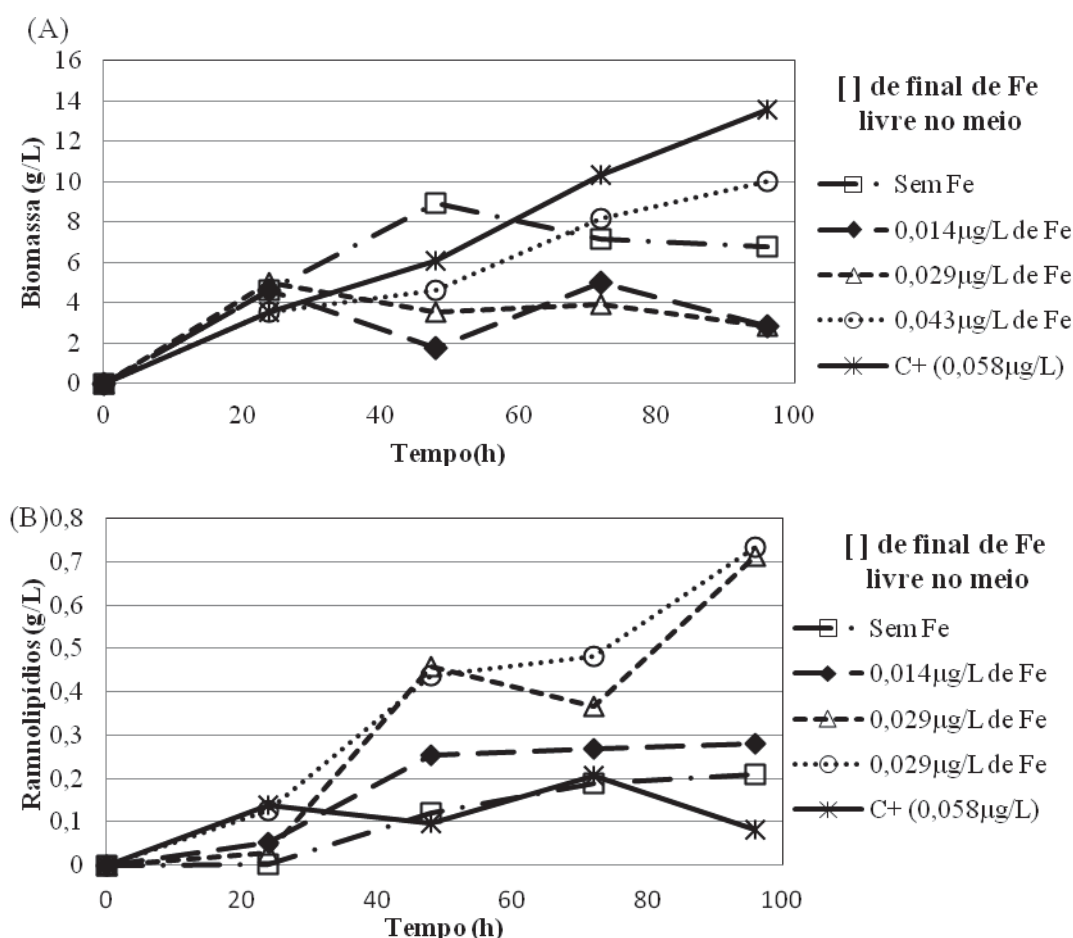


Figura 5: Biomassa (g/L) (A) Produção de ramnolipídios (g/L) (B), de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de ferro.

O ferro é um elemento essencial para a manutenção do micro-organismo e se mostrou necessário para a produção de ramnolipídios, uma vez que em concentrações inferiores a $0,029\mu\text{g/L}$ a produção de ramnolipídios, praticamente estabilizou após 48h de fermentação.

5.3 Cobalto

A seguir serão apresentados os dados resultantes da variação da concentração de cobalto no meio de cultura (Fig. 6).

A biomassa máxima foi alcançada utilizando a concentração controle de elementos traço. O cobalto é um elemento constituinte da vitamina B12, que participa da síntese das desoxirriboses, que são constituintes do DNA (MADIGAN et al, 2010), portanto a ausência desse elemento pode ser um fator limitante para a replicação celular, por esse motivo concentrações inferiores a $0,247\mu\text{g/L}$ apresentaram uma redução na biomassa bacteriana (Fig 6).

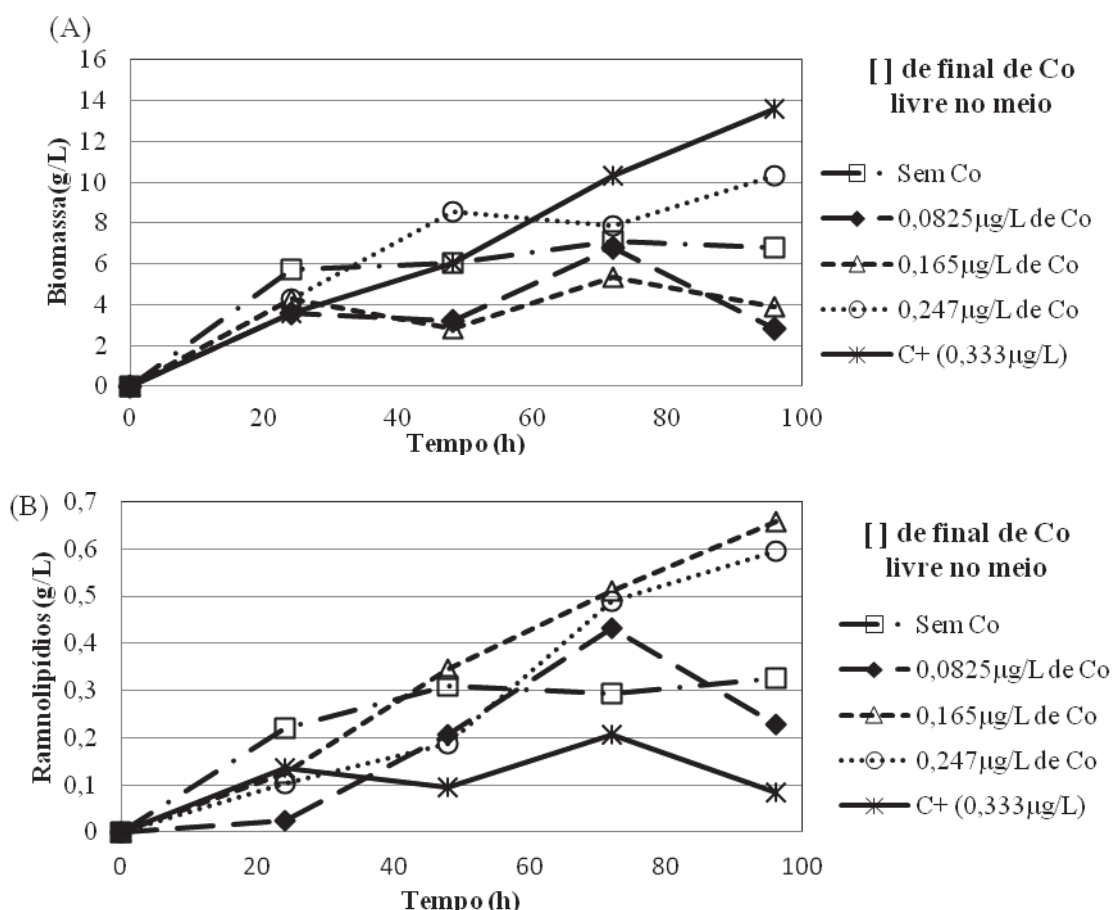


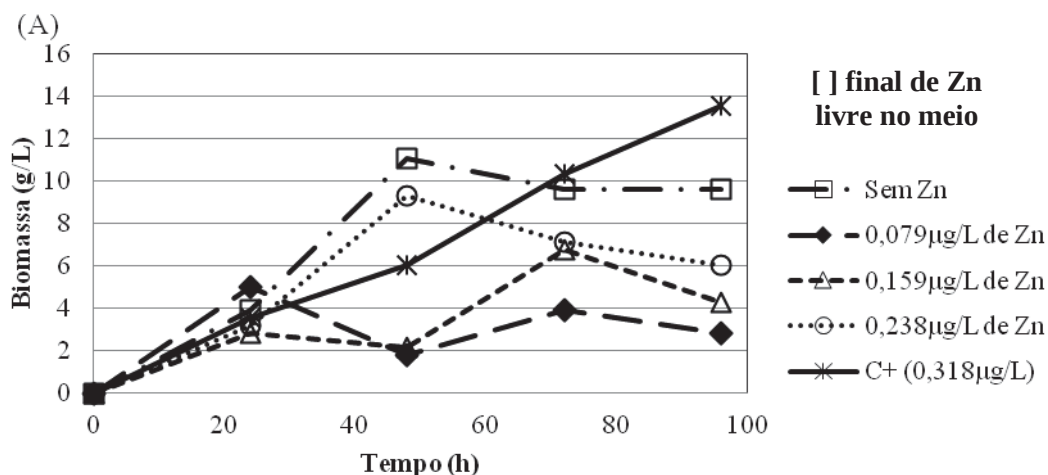
Figura 6: Biomassa (g/L) (A) Produção de ramnolipídios (g/L) (B), de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de Cobalto.

Os experimentos realizados variando a concentração de cobalto apresentaram os melhores resultados para a produção de ramnolipídios nas concentrações de 0,165 $\mu\text{g/L}$ e 0,247 $\mu\text{g/L}$ deste elemento (Fig. 6B). O emprego de 0,165 $\mu\text{g/L}$ de cobalto poderá ser adotado em fermentações futuras, já que, a quantidade de ramnolipídios obtida nestas condições não diferem estatisticamente ($p = 0,349$) e, portanto, por questão de custos, estabelecer-se-á a menor concentração do elemento no desenvolvimento do meio de cultura.

5.4 Zinco

Os resultados dos experimentos, onde se avaliou a importância do Zn para o crescimento microbiano e produção de biotensoativos por *P. aeruginosa* LBI 2A1, estão apresentados na Fig. 7.

O aumento da biomassa variou nas diferentes concentrações de Zn presente no meio de cultura. Em concentrações menores que o controle pode-se observar uma queda no crescimento do micro-organismo, após 48 horas de fermentação (Fig. 7A), o que pode estar relacionado ao fato de que o Zn é um metal traço associado à replicação celular, uma vez que esse elemento é um ligante da DNA polimerase (MADIGAN et al, 2010), o que explica a queda na biomassa quando em concentração inferior ao controle.



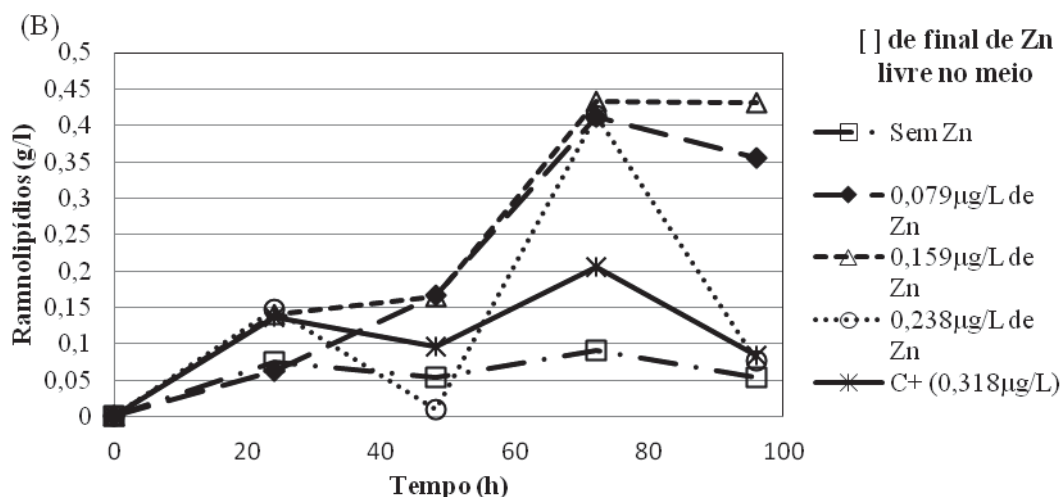


Figura 7: Biomassa (g/L) (A) e Produção de ramnolipídios (g/L) (B), de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de Zinco.

As concentrações de zinco em que se obteve maior produção de ramnolipídios foram, 0,079 µg/L e 0,159 µg/L de Zn, atingindo 0,35 e 0,42 g/L de ramnolipídios, respectivamente (Fig. 7B). O aumento na produção do biotensioativo nas concentrações supra citadas pode estar relacionado a limitação de nutrientes, a literatura indica que condições de estresse e limitações de nutrientes pode favorecer a produção de biossurfactantes (FIECHTER, 1992; GUERRA-SANTOS et al. 1986).

Diversos autores avaliaram o efeito da proporção C/N na produção de ramnolipídios, indicando que baixas proporções de C/N resultaram em um aumento na produção (GUERRA-SANTOS et al, 1984; RAZA et al, 2007; WU et al, 2007; LOVAGLIO et al, 2010). A falta de nitrogênio é um fator limitante para o crescimento microbiano, portanto, na ausência desse elemento no meio ocorre um direcionamento da fonte de carbono para a síntese de ramnolipídios. O mesmo pode ter ocorrido com a limitação de Zn no meio de cultura, pois o crescimento microbiano declinou no tempo de 48 horas, em todos os ensaios exceto no controle. Nesses experimentos a produção de ramnolipídios aumentou após 48 horas de cultivo, o que comprova que a limitação desse elemento traço pode favorecer um desvio do fluxo de carbono para a formação de ramnolipídios.

5.5 Cobre

A biomassa máxima atingida, assim como ocorreu com os resultados anteriores, foi a do experimento controle (Fig.8). A queda na biomassa microbiana quando a concentração de Cu no meio de cultura diminuiu, era prevista, uma vez que, o cobre está relacionado às enzimas

da respiração celular (MADIGAN et al, 2009), portanto esse elemento é importante para obtenção de energia pelas células microbianas.

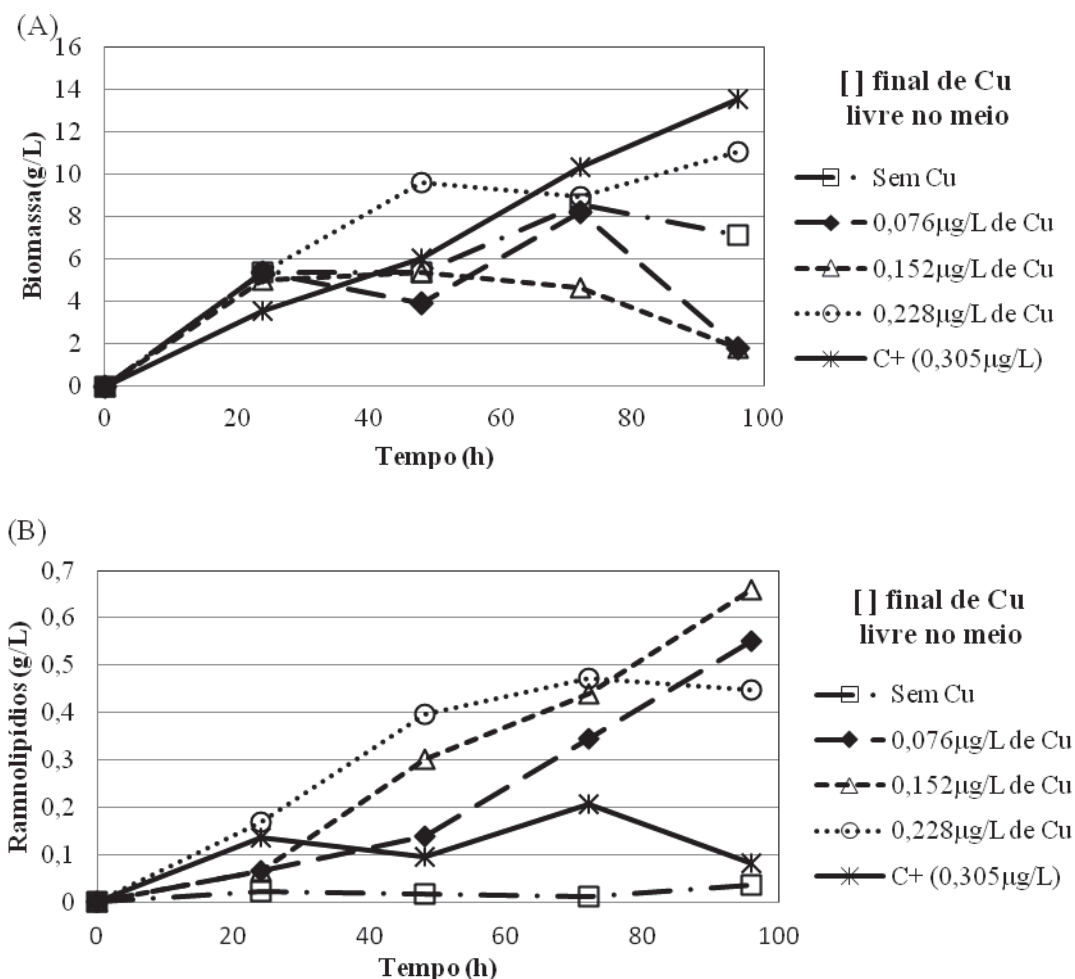


Figura 8: Biomassa (g/L) (A) e Produção de rhamnolipídios (g/L) (B), de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de cobre.

As concentrações de cobre mais favoráveis para a produção de rhamnolipídios foram 0,152 µg/L e 0,076 µg/L de Cu, atingindo respectivamente 0,66 g/L e 0,55 g/L. O aumento na produção desse biossurfactante pode estar associado às condições de estresse, esse fato é plausível, uma vez que uma das proposições para a função dos biossurfactantes é: que eles são produzidos afim de facilitar a colonização de ambientes hostis (SOBERÓN-CHAVEZ et al., 2011; FIECHTER, 1992; GUERRA-SANTOS et al. 1986). Portanto concentrações entre 0,152 µg/L e 0,076 µg/L de Cu seriam as ideais para a produção de rhamnolipídios.

5.6 Manganês

Os dados obtidos com a variação da concentração de manganês no meio de culturas estão descritos na Fig. 9.

Observa-se que nas concentrações entre 0,065µg/L e 0,195µg/L de manganês, houve estabilização ou queda da biomassa (Fig. 9A).

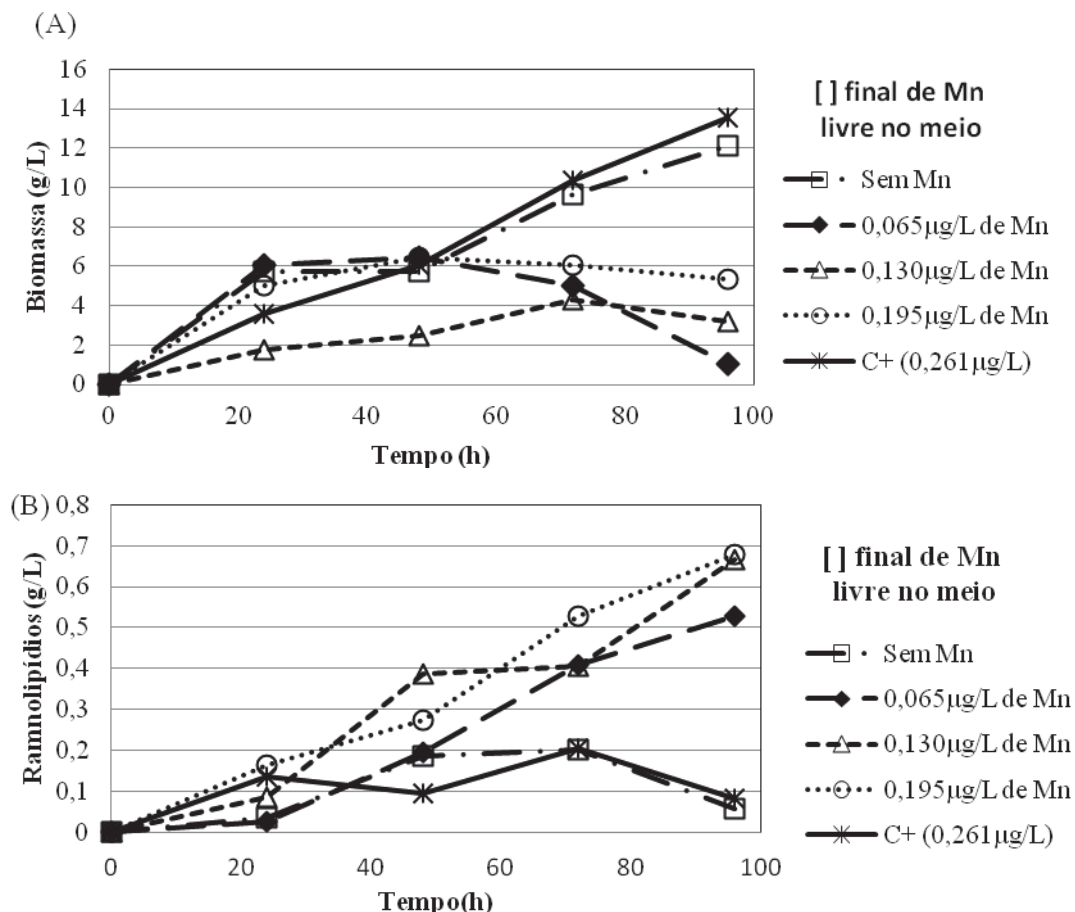


Figura 9: Biomassa (g/L) (A) e Produção de rhamnolipídios (g/L) (B), de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 cultivada em diferentes concentrações de cobre.

A produção de rhamnolipídios foi favorecida nas concentrações de 0,130µg/L e 0,195µg/L de Mn livre no meio, atingindo 0,66 e 0,68 g/L. Há relatos na literatura de que o manganês estimula a produção de metabólitos secundários em *Bacillus subtilis* (COOPER et al., 1981), foi relatada também por Wei et al., (2003), que este elemento estimula a produção de surfactina, biossurfactante da classe dos lipopeptídios. Apesar das diferenças da espécie microbiana e classe de biossurfactante produzidos, os resultados observados neste estudo estão de acordo com essas afirmações.

O Mn está, também, relacionado a enzimas do ciclo do ácido cítrico, pois ele é um ativador das enzimas málicas, e também é necessário para a oxidação do isocitrato, sendo um ligante da enzima isocitrato desidrogenase (KRISHNAN et al, 2009). De acordo com a proposição elaborada por Lovaglio (2011), a síntese da porção hidrofílica do ramnolipídios (uma ou duas moléculas de ramnose) passa pelo ciclo do glioxilato e posteriormente pelo ciclo do ácido cítrico, portanto a influência desse elemento traço pode assim como o citrato estar associada a produção das moléculas de ramnose uma vez que as enzimas citadas são responsáveis pela conversão de malato a oxaloacetato e de citrato a isocitrato, sendo requeridas na rota metabólica apresentada na figura 4.

5.7 Melhores concentrações para cada micronutriente

Mediante aos resultados apresentados, propõe-se que a solução de elementos traços para produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 seja preparada com as concentrações propostas na Tabela 1.

Tabela1: Concentrações ideais de cada elemento traço para elaboração do meio de cultura para a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1

	MMLCF	Concentração (g/L) ideal de cada elemento
Citrato de sódio dihidratado	2,00 g/L	1,5
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,28 g/L	0,14
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,40 g/L	0,7
CoCl ₂ 6H ₂ O	1,20 g/L	0,6
CuSO ₄ 5H ₂ O	1,20 g/L	0,6
MnSO ₄ H ₂ O	0,80 g/L	0,4

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que o meio de cultura utilizado (Meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato), que já vem sendo descrito como um meio de cultura bom para a produção de ramnolipídios, pode ser otimizado alterando as concentrações dos elementos traços presentes no mesmo. Além disso, o presente estudo comprova a importância dos elementos traços na produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, uma vez que a alteração na concentração de apenas um elemento (Fe) provocou aumento de mais de 3 vezes na produção desse biotensioativo. Um acréscimo dessa magnitude pode ajudar a ampliar e viabilizar a produção de ramnolipídios, promovendo assim uma maior inserção mercadológica desse produto, uma vez que a produtividade e alto custo de produção são os principais responsáveis pela baixa competitividade dos biossurfactantes frente aos surfactantes de origem química.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho cria perspectivas para a realização de futuros trabalhos a partir dos dados já coletados, a fim de verificar a interação entre esses elementos, variando a concentração de mais de um elemento simultaneamente. Além disso, a realização de fermentações utilizando concentrações ajustadas dos elementos traços, de acordo com os resultados obtidos nesse estudo, pode acarretar em aumento significativo na produção de ramnolipídios

Outro ponto para uma possível avaliação é verificar a influencia do citrato e do manganês na síntese da porção hidrofílica dos ramnolipídios, o que ajudaria na elucidação de uma fração da rota biossintética desse metabólito.

8. 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.
- ABDEL-MAWGOUD A. M; ABOULWAFI M. M; HASSOUNA N.M, Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5 **Appl Biochem Biotechnol** v.150 p.305–325, 2008.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antartica*. **Biotechnol. Letters**, Dordrecht, v. 22, p. 313-316, 2000.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Appl. Environ. Microbiol**, 45, 162-168, 1996.
- 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.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, v.85, p.1-8, 2004.
- BENINCASA, M ; ACCORSINI, R, A. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology** V.99 , p.3843–3849 , 2008.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Oxford, v. 50, p. 520-529, 1998.
- CHANG, J.S.; CHOU, C.L.; LIN, G. H.; SHEU, S. Y.; CHEN, W.M. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. **Syst. and Appl. Microbiol.**, Stuttgart, v. 28, n. 2, p. 137-144, 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.
- COOPER DG, MACDONALD CR, DUFF SJ, KOSARIC N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Appl Environ Microbiol** p.42 p.408–12, 1981.

DEZIEL, E.; LEPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1485, 145-152, 2000.

DEKIMPE, V., DEZIEL, E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. **Microbiol.**, v.155, p.712–723, 2009.

DUAN, K. e SURETTE, M. Environmental Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl Quorum-Sensing Systems. **J. Bacteriol.**, v.189, n. 13, 2007.

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

GAMBELLO, M. J.; KAYE, S.; IGLEWSKI, B.H. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. **Infect Immun.**, v. 61, p. 1180 – 1184, 1993.

GLICK R.; CHRISTIE G.; JULIEN T.; SHIRLEY S.; OFIR A.; ERIC D.; GREENBERG P.; POOLE K.; BANIN E. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology** p. 2973-80. 2010.

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.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v.24, p. 443-448, 1986.

HABA, E., PINAZO, A., JAUREGUI, O., ESPUNY, M.J., INFANTE, M.R., MANRESA, A., Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering** v.81, p.316–322, 2002.

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

JOSHI, S.; SANJAY, Y.; ANURADHA N.; DESAI J. Statistical Optimization of Medium Components for the Production of Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51 **J. Microbiol. Biotechnol** v.17 p. 313-319,2007.

KITAMOTO, D., ISODA, H., NAKAHARA, T.,. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v.94, p.187–201, 2002

KÖHLER, T.; CURTY, L. K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHÈRE, J. C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 182, p. 5990-5996, 2000

KRISHNAN K. P; SINHA R. K; KRISHNA K; NAIR S; SINGH S. M. Microbially mediated redox transformations of manganese (II) along with some other trace elements: a study from Antarctic lakes **Polar Biol** v.32 p.1765–1778, 2009.

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.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LIN, S.-C., SHARMA, M. M., AND GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnol. Prog.** V.9, p.138–145, 1993.

LIN, S.C. *et al.*, Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 23, p. 267-273, 1998.

LIESKE R ZUR Ernährungsphysiologie der Eisenbakterien. **Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infektionskr Hyg Abt** v.49 p. 413–425, 1919.

LOVAGLIO R. B.; COSTA, S.S.G.V.A.O.; GONÇALVES, L. A.G.; CONTIERO, J. Effect of C/N Ratio and Physicochemical Conditions on the Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI **Libyan Agriculture Research Center Journal International** v.1 p.85-92, 2010.

LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JUNIOR, M. J.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.85 p.301–305, 2011.

LOVAGLIO, R. B. Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI **Tese de Doutorado, depositada na biblioteca virtual da UNESP**, 20011.

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.

MANDIGAN M. T; MARTINKO J.M; DUNLAP P.V; CLARK D.P. Micro biologia de Brock 12º Ed. **Pearson Education, inc.**, p.109-110, 2010.

MANRESA, A.; BATISDA, J.; MERCADÉ, M. E.; ROBERT, M.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M.J.; GUINEA, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Society for Ind. Microbiol.** Amsterdam, v. 8, p. 133-136, 1991.

MARSUDI S, UNNO H, HORI K Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Microbiol Biotechnol** V.78 P.955–961, 2008.

MATA-SANDOVAL, J.; KARNS, J.; TORRENTS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the productions and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. **Microbiol. Res.** V.155, p.249-256, 2001.

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

MÜLLER, M M, HÖRMANN, B, SYLDATK, C, HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, p. 167-174, 2010.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, p. 3016-3019, 1989.

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

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ. Pollution**, Barking, v. 133, p. 183-198, 2005.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K. ; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 25, 2008.

NELSON D.L; COX M. M.Principios de bioquímica, 4ªed. **Salvier editora de livros médicos ltda**, 2006.

PEARSON, J.P.; GRAY, K.M.; PASSADOR, L.; TUCKER, K.D.; EBERHARD, A.; IGLEWSKI, B.H.; GREENBERG, E.P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 91, p. 197 – 201, 1994.

POIRIER, I., JEAN, N., GUARY, J. C., & BERTRAND, M. Responses of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* to an excess of heavy metals: physiological and biochemical aspects. **The Science of the total environment**, v.406 p. 76-87,2008.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Effect of Nutrients on Optimal Production of Biosurfactantsby *Pseudomonas putida*—A Gujarat Oil Field Isolate. **journal of Surfactants and Detergents**, India, v. 6, p.65-68, 2003.

RAHMAN, K.S.M., RAHMAN, T.J., KOURKOUTAS, Y., PETSAS, I., MARCHANT, R., BANAT, I.M., Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial

consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* v.90, p.159–168, 2003.

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**, Dordrecht, v. 18, p. 115-121, 2007.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnol.Lett.**, Dordrecht, v.1, n.2, p.871-874, 1989.

ROSENBERG E, RON EZ . High and low molecular mass microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol** v.52 p.154-162, 1999.

SANDRIN, T.R., CHECH, A.M., MAIER, R.M.,. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. **Applied in Environmental Microbiology** v.66, p.4585–4588, 2000.

SARTORY A, MEYER J Contribution a letude du metabolisme hydr- carbone des bacteries ferrugineuses. **CR Acad Sci** v.225 p.541–542, 1947.

SHEPPARD, J. D.; COPPER, D. G. The effect of biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. **J.Chem. Technol. Biotechnol.**, Oxford, v. 48, p. 325-336, 1990

SIM L.; WARD, O.P.; LI Z.Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v.19 , 232-238, 1997.

SOBERÓN-CHAVEZ, G.; AGUIRRE-RAMIREZ, M.; SANCHEZ, R. The *Pseudomonas aeruginosa* Rhla enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Hampshire, v. 32, n. 11-12, p. 675-677, 2005.

SOBERÓN-CHÁVEZ G., MAIER R M.: Biosurfactants: A General Overview In: Soberón-Chavez Glória (Ed.) Biosurfactants from genes to application. 1ª ed. 2011, p. 13 -5.

SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F. Chemical and physical characterization of 4 interfacial-active rhamnolipids from pseudomonas spec dsm 2874 grown on normal-alkanes. **Zeitschrift fur Naturforschung c-a Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 40, n. 1-2, p. 51-60, 1985.

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, 1987, p. 89-120.

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.

VENKATA RAMANA, K.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **J.Chem. Technol. Biotechnol.**, Oxford, v. 45, p. 249-257, 1989.

WANG Q, FANG X, BAI B, LIANG X, SHULER PJ, GODDARD WA, TANG Y. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. **Biotechnol Bioeng** v. 98:p.842–853, 2007.

WU, J. Y.; YEH, K.L.; LU, W.B.; LIN, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresour. Technol.**, 2007, doi: 10.1016/j.biortech.2007.02.026.

WEI YH, WANG LF, CHANG JS, KUNG SS. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **J Biosci Bioeng** v.96p.174–8 20003.

WEI , Y.; LAI , C.; CHANG, J. Using Taguchi experimental design methods to ptimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 **Process Biochemistry.**, v.42p. 40–45 2006

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Bioreactor design foe enhanced carrier – assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Proc. Biochem.**, v. 41, p. 1799-1805, 2006.

ZHU L, ZHANG M Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass. *Environ Pollut* (Amsterdam, Netherlands) v.156, P. 46–52, 2008.

Rio Claro, 06 de Dezembro de 2011

Assinatura do aluno

(Vinícius Luiz da Silva)

Assinatura do orientador

(Prof. Dr. Jonas Contiero)

Assinatura da co-orientadora

(Dra. Roberta Barros Lovaglio)