
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

**“DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO PARA
PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 EM
BIORREATOR”**

VINÍCIUS LUIZ DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada.

VINÍCIUS LUIZ DA SILVA

**“DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO PARA
PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 EM
BIORREATOR”**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Biológicas
- Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientadora: Dra. Roberta Barros Lovaglio

Rio Claro

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

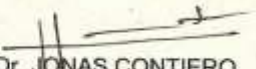
TÍTULO: DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE
RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 EM BIORREATOR

AUTOR: VINICIUS LUIZ DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

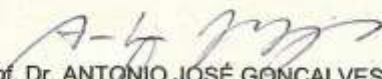
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROBERTA BARROS LOVAGLIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora;

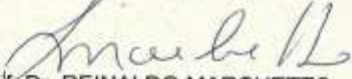


Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Campus de Rio Claro - Ib / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ GONÇALVES DA CRUZ
Departamento de Engenharia Química / UFSCar



Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO

Instituto de Química de Araraquara / UNESP, campus Araraquara

Data da realização: 03 de abril de 2014.

620.1122 Silva, Vinícius Luiz da
S586d Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de
ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em biorreator /
Vinícius Luiz da Silva. - Rio Claro, 2014
114 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Coorientador: Roberta Barros Lovaglio

1. Biodegradação. 2. Microbiologia industrial. 3. Biossurfactantes. 4.
Germinação. 5. Inseticida. I. Título.

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

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1	BIOSURFACTANTES	20
1.1.1	Classificação e estrutura dos biosurfactantes	20
1.2	BIOSÍNTESE DOS BIOSURFACTANTES	23
1.3	APLICAÇÕES	24
1.3.1	Função biológica dos biosurfactantes	25
1.3.2	Biosurfactantes na medicina	26
1.3.3	Aplicações na agroindústria	26
1.3.4	Biorremediação	27
1.3.5	Outras aplicações	28
1.4	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	29
1.4.1	Substratos alternativos	29
1.4.2	Fatores que influenciam a produção	30
1.4.3	Produção em biorreatores	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	GERAIS	32
2.1.1	Específicos	33
3	CAPÍTULO I - PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS EM BIORREATOR POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> LBI 2A1	34
3.1	INTRODUÇÃO	35
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.2.1	Micro-organismo	36
3.2.2	Meios de cultura	37
3.2.2.1	Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato	37
3.2.2.2	Meio Mineral livre de cálcio	37
3.2.2.3	Definição da concentração de glicose a ser utilizada nos ensaios em biorreator	38
3.2.3	Ensaio em frascos	38
3.2.4	Condições de cultivo	39
3.2.4.1	Preparo do Inóculo	39
3.2.4.2	Experimentos Biorreator	39

3.2.4.2.1	Experimento utilizando a mistura de glicose e óleo de soja como fonte de carbono	39
3.2.4.3	Cultivos realizados no modo batelada alimentada	39
3.2.4.3.1	Alimentação por pulso único	39
3.2.4.3.2	Alimentação com vazão contínua	40
3.2.5	Métodos analíticos	40
3.2.5.1	Processamento das amostras	40
3.2.6	Avaliação da produção de Ramnolipídios	40
3.2.6.1	Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada	40
3.2.6.2	Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC	40
3.2.6.2.1	Derivatização	40
3.2.6.2.2	HPLC	41
3.2.7	Determinação da biomassa microbiana	41
3.2.8	Determinação do óleo residual	41
3.2.9	Determinação da borra de óleo de milho residual	42
3.2.10	Determinação da glicose residual	42
3.2.11	Quantificação de nitrogênio	42
3.2.12	Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios por Espectrometria de Massa	42
3.2.12.1	Espectrometria de Massa – ESI-MS	42
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.3.1	Bioprocesso 1: produção de ramnolipídios utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte de carbono	44
3.3.1.1	Velocidades específicas	45
3.3.1.2	Fatores de conversão	46
3.3.2	Bioprocesso 2: produção de ramnolipídios utilizando 250g/L de borra de óleo de milho como fonte de carbono	47
3.3.2.1	Velocidades específicas	49
3.3.2.2	Fatores de conversão	51
3.3.3	Bioprocesso 3: produção de ramnolipídios utilizando glicose como fonte de carbono	52
3.3.3.1	Ensaio em frascos	52

3.3.3.2	Bioprocesso 4: produção de ramnolipídios utilizando 100g/L de Glicose como fonte de carbono	55
3.3.3.3	Velocidades específicas	56
3.3.3.4	Fatores de conversão	57
3.3.4	Bioprocesso 5: produção de ramnolipídios utilizando Glicose e óleo de soja como fonte de carbono	58
3.3.4.1	Velocidades específicas	59
3.3.4.2	Fatores de conversão	60
3.3.5	Bioprocesso 6: cultivo alimentado por pulso único para a produção de ramnolipídios utilizando óleo de soja como fonte de carbono.	61
3.3.5.1	Velocidades específicas	62
3.3.5.2	Fatores de conversão	63
3.3.6	Bioprocesso 7: cultivo alimentado com vazão constante para a produção de ramnolipídios utilizando óleo de soja como fonte de carbono.	63
3.3.6.1	Velocidades específicas	64
3.3.6.2	Fatores de conversão	65
3.3.7	Homólogos de Ramnolipídios produzidos no cultivo utilizando óleo de soja e glicose como fonte de carbono.	66
4	CAPITULO II - INFLUÊNCIA DOS RAMNOLIPÍDIOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES	71
4.1	INTRODUÇÃO	72
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	73
4.2.1	Micro-organismo	73
4.2.2	Meio de cultura	73
4.2.2.1	Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato	73
4.2.2.2	Meio Mineral livre de cálcio	73
4.2.3	Purificação do ramnolipídios produzido	73
4.2.4	Espécies avaliadas	74
4.2.5	Assepsia externa das sementes	74
4.2.6	Teste de germinação das sementes	74
4.2.7	Quantificação do crescimento das raízes e medida de massa seca	74
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.3.1	Germinação de sementes de alface	74

4.3.2	Germinação de sementes de Milho.....	78
4.3.3	Germinação de sementes de Soja	82
4.3.4	Germinação de sementes de girassol	86
5	CAPITULO III - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA E REPELENTE DOS RAMNOLIPÍDIOS FRENTE A AEDES AEGYPTI.....	91
5.1	INTRODUÇÃO	92
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	93
5.2.1	Micro-organismo	93
5.2.2	Meio de cultura.....	93
5.2.2.1	Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato.....	93
5.2.2.2	Meio Mineral livre de cálcio	93
5.2.3	Purificação do ramnolipídios produzido.....	93
5.2.4	Obtenção dos mosquitos.....	94
5.2.5	Manutenção dos indivíduos	94
5.2.6	Postura de ovos e manutenção larval.....	94
5.2.7	Testes da ação larvicida dos ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	94
5.2.8	Testes de repelência dos ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	95
5.2.9	Testes da ação inseticida dos ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	95
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
5.3.1	Ação larvicida dos ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	96
5.3.2	Efeito inseticida dos ramnolipídios em adultos.....	101
5.3.3	Repelência dos ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	102
6	CONCLUSÃO.....	104
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-1: 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.....	22
Figura 3-1: Cromatografia em camada delgada evidenciando a produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 em cultivo em batelada utilizando 250g/L de óleo de Soja como fonte de carbono.....	43
Figura 3-2: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte de carbono.	44
Figura 3-3: Velocidades específicas de formação de biomassa (μx), produto (μp) e consumo de substrato (μs) utilizando óleo de soja como fonte de carbono.	45
Figura 3-4: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato e Nitrogênio (g/L) da linhagem <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando 250g/L de Borra de óleo de milho como fonte de carbono	48
Figura 3-5: Velocidades específicas de formação de biomassa (μx), produto (μp) e consumo de substrato (μs) utilizando Borra de óleo de Milho como fonte de carbono.	50
Figura 3-6: Produção de ramnolipídios mantendo a mesma proporção de carbono e nitrogênio do cultivo utilizando óleo de soja, (A) 100g/L, (B) 150g/L , (C) 200g/L e (D) 250g/L de glicose	53
Figura 3-7: Produção de ramnolipídios mantendo a concentração de nitrato em 1,5g/L de NaNO_3 e variando a concentração de glicose, (A) 100g/L, (B) 150g/L , (C) 200g/L e (D) 250g/L de glicose	54
Figura 3-8: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando 100g/L de glicose como fonte de carbono	56
Figura 3-9: Velocidades específicas de formação de biomassa (μx), produto (μp) e consumo de substrato (μs) utilizando 100g/L de glicose como fonte de carbono.....	57
Figura 3-10: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando 50g/L de glicose e 233,5g/L de óleo de soja como fonte de carbono	58

Figura 3-11: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando 50g/L de glicose e 233,5g/L de óleo de soja como fonte de carbono	59
Figura 3-12: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte de carbono a alimentada com pulso no tempo de 58h com 23,85g/L de óleo de soja (a seta marca o início da alimentação).	61
Figura 3-13: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando óleo de soja como fonte de carbono, e alimentação com um pulso único.....	62
Figura 3-14: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte de carbono a alimentada com fluxo contínuo (a seta laranja marca o início da alimentação).....	63
Figura 3-15: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando óleo de soja como fonte de carbono, e alimentação contínua.	65
Figura 3-16: ESI (-) – MS de amostras de ramnolipídios produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando a mistura glicose e óleo de soja como fonte de carbono (A) 38, (B) 86, (C) e 158 horas de cultivo.....	67
Figura 4-1: Germinação acumulada de sementes de <i>L. sativa</i> na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios.	75
Figura 4-2: Frequência relativa de sementes de alface germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.	76
Figura 4-3: plântulas de <i>L. sativa</i> nos diferentes tratamentos após o termino do experimento.	77
Figura 4-4: Comprimento médio das raízes das plântulas germinadas e massa seca média das sementes germinadas, nos grupos experimentais: controle, 0,025 , 0,05, 0,075 e 1% p/V de ramnolipídios	78
Figura 4-5: Germinação acumulada de sementes de <i>Zea mays</i> na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios	79

Figura 4-6: frequência relativa de sementes de milho germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.....	80
Figura 4-7: plântulas de Zea mays nos diferentes tratamentos após o termino do experimento	81
Figura 4-8: comprimento médio e massa seca das raízes das plântulas de milho germinadas, nos grupos experimentais: controle, 0,025, 0,05, 0,075 e 1% p/v de ramnolipídios.....	82
Figura 4-9: Germinação acumulada de sementes de Glycine max na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios.....	83
Figura 4-10: frequência relativa de sementes de soja germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.....	84
Figura 4-11: plântulas de Glycine max nos diferentes tratamentos após o termino do experimento.	85
Figura 4-12: comprimento médio das raízes e massa seca das plântulas germinadas de soja nos grupos experimentais: controle, 0,025 , 0,05, 0,075 e 1% p/V de ramnolipídios.	86
Figura 4-13: Germinação acumulada de sementes de Helianthus annuus na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios.....	87
Figura 4-14: Frequência relativa de sementes de girassol germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.....	88
Figura 4-15: plântulas de Helianthus annuus nos diferentes tratamentos.	89
Figura 4-16: comprimento médio das raízes das plântulas germinadas de girassol nos grupos experimentais : controle, 0,025 , 0,05, 0,075 e 1% p/V de ramnolipídios.....	90
Figura 5-1: número de larvas vivas ao longo do tempo nos diversos tratamentos.....	96
Figura 5-2: Tempo de permanência das larvas na superfície.	98
Figura 5-3: número de tentativas sem sucesso das larvas em permanecer na superfície	99
Figura 5-4: Tempo de permanência das larvas no fundo do reservatório.	100
Figura 5-5: (A) A. aegypti submetido ao tratamento controle (aumento de 50x), (B) A. aegypti submetido a solução contendo 1000mg/L de ramnolipídios (aumento 50x) e (C) região do indivíduo retratado em (B) com um aumento do 100x.....	102

Figura 5-6: Porcentagem média de mosquitos pousados em cada tratamento.	103
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: fontes de carbono utilizadas e suas concentrações.....	37
Tabela 3-2: Concentração de glicose, nitrogênio e proporção C/N avaliadas nos experimentos em frasco.....	38
Tabela 3-3: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, utilizando óleo de soja como fonte de carbono	47
Tabela 3-4: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono.	51
Tabela 3-5: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, utilizando 100g/L de glicose como fonte de carbono. Tirar bordas.	57
Tabela 3-6: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, utilizando glicose e óleo de soja como fonte de carbono, os fatores de conversão expostos foram calculados frente ao total da fonte de carbono.	60
Tabela 3-7: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$	63
Tabela 3-8: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$	65
Tabela 3-9: Composição química e abundância relativa de ácidos graxos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 ao longo do cultivo utilizando a mistura glicose + óleo de soja como fonte de carbono.	68
Tabela 3-10: Composição química e abundância relativa dos homologos de ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 ao longo do cultivo utilizando a mistura glicose + óleo de soja como fonte de carbono.	69
Tabela 5-1: Número de adultos de <i>A. aegypti</i> vivos nos diferentes tratamentos.	101
Tabela 5-2: Tempo médio de permanência dos mosquitos sobre os camundongos em minutos.	103

LISTA DE ABREVIACÕES

RL - Ramnolipídio

CMC - Concentração micelar crítica

BOM - Borra de óleo de milho

PQS - Pseudomonas Quinolona Sinal

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

MS - Mass spectrometry

CCD- Cromatografia em camada delgada

RESUMO

Surfactantes são moléculas anfipáticas, que devido à presença de regiões com polaridades distintas apresentam propriedades únicas como a capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial. Os biossurfactantes são moléculas biológicas que podem ser sintetizados por uma ampla gama de seres vivos, no entanto os produtores mais estudados são os micro-organismos. Apesar das inúmeras vantagens dos tensoativos biológicos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e alta estabilidade, estes compostos não são amplamente utilizados, devido ao custo de produção. Por esse motivo, o presente estudo busca a otimização da produção de ramnolipídios em biorreatores. Para tal realizou-se cultivos operados nos modos batelada e batelada alimentada. Dentre os cultivos realizados o que obteve maior produção e produtividade foi operado no modo batelada, nesse bioprocessos foram utilizados 250 g/L de óleo de soja como fonte de carbono. A produção máxima atingida foi 36,4 g/L de ramnolipídios e a produtividade 0,23 g/L.h. Além do aumento na produção desse bioproduto é importante descobrir novas aplicações para esse biotensoativo, dessa maneira o valor agregado dos ramnolipídios aumenta tornando a produção e comercialização em larga escala atraente para as indústrias. Com a finalidade de agregar valor aos ramnolipídios o presente trabalho avaliou duas aplicações para esse biossurfactante. Verificou-se a influência dos ramnolipídios na germinação de sementes de alface, milho girassol e soja. Quando em contato com os surfactantes as sementes de alface tiveram sua germinação favorecida em 175,5%, porém o desenvolvimento das plântulas foi prejudicado. As sementes de milho tiveram a germinação e o desenvolvimento favorecidos nas concentrações de 0,025 e 0,05% p/v de ramnolipídios. Com relação às sementes de soja não houve influência na germinação, porém a aplicação de ramnolipídios favoreceu o desenvolvimento das plântulas. Em relação às sementes de girassol, tanto o desenvolvimento quanto a germinação foram influenciados positivamente em todas as concentrações avaliadas. Avaliou-se ainda o potencial inseticida dos ramnolipídios frente a larvas e adultos de *Aedes aegypti*. Quando empregado nas concentrações 1000 900 800mg/L os ramnolipídios eliminaram todas as larvas dessa espécie de mosquito em apenas 18h, a concentração de 1000mg/L foi capaz de eliminar 100% dos adultos e ainda apresentou repelência frente os mesmos.

Palavras chaves: Ramnolipídios, *Pseudomonas aeruginosa*, Biossurfactantes, Germinação, inseticida, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules that due to the presence of regions with different polarities have unique properties such as the ability to reduce the interfacial and surface tension. The biosurfactants are biological molecules that can be synthesized by a wide range of organisms, however the most studied producers are microorganisms. Despite the numerous benefits of biological surfactants, such as low toxicity, biodegradability and high stability, these compounds are not widely used because of the high production cost. For this reason, this study aims to optimize the production of rhamnolipids in bioreactors, for such was employed cultivation in batch and feed batch. The cultivate that achieved the highest production and yield was a batch using 250 g/L of soybean oil as carbon source, the culture reached 36.4 g/L of rhamnolipids and 0.23 g/Lh of productivity. Beyond to increase this bioproduct production, it is important to find new applications for this biosurfactant, helping to aggregate value for them, the present study evaluated two applications for rhamnolipid. The first one evaluated the influence of rhamnolipids on seeds germination. When in contact with surfactants the lettuce seeds had their germination increased 175%, however the seedlings showed a less development, the corn seeds had their germination and seedling favored at 0,025 to 0,05 % w/v concentrations. Regarding soybean seeds there was no effect on germination but favored seedling development. In relation to sunflower seeds, both ,the development and germination, were positively influenced at all concentrations evaluated. The second application evaluated was the rhamnolipids insecticidal potential, against adults and larvae of *Aedes aegypti*. When used at concentrations 1000 900 800mg/L rhamnolipids eliminated all the larvae of this mosquito species in only 18h, the concentration of 1000mg / L was able to remove 100% of adults and also showed repellency against adults during blood feeding.

Key words: rhamnolipids, *Pseudomonas aeruginosa*, Biosurfactants, germination, insecticidal, *Aedes aegypti*.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Adevair P. da Silva e Sônia E. Luiz
que me impulsionaram nessa jornada pela vida e
A minha esposa Camila A. Kuhl da Silva companhia
essencial para que eu siga caminhando.

**“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas
se eu quiser conhecer as borboletas”
Antoine de Saint-Exupéry.**

AGRADECIMENTOS

A Deus nosso pai criador, que me inspira e me guia, me proporcionando força para seguir em frente e lutar pelos meus sonhos, que ele possa sempre me mostrar o caminho e que assim eu possa a cada dia ser um ser humano melhor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Contiero, por todo o suporte que tem me proporcionado ao longo de minha vida acadêmica.

A minha co-orientadora Dra. Roberta Barros Lovaglio, que é um exemplo de pessoa e profissional, cuja ajuda sempre valiosa me coloca nos trilhos nos momentos em que preciso de um norte, pelas conversas e amizade, obrigado por ser minha amiga leal dentro e fora do laboratório, e ao Lê e o Theo pela amizade e por dividirem o tempo da Rô comigo.

Aos amigos de laboratório, cuja a companhia torna as horas de pesquisa mais leves e alegres (Luciana, Fabricio, Paulo, Marcela, Paola, Grazi, Regiane, Natalia, Mariana, Lorenzo e Vitor)

Aos amigos cuja passagem pelo LMI se encerrou, porém a amizade e a boa energia que deixaram continuam (Túlio, Kate, adoro vocês)

Aos técnicos do departamento de bioquímica e microbiologia do IB da UNESP de Rio Claro (Beto, Adriano, Carmem e Fátima).

A todos os colegas do departamento, que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

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

Aos amigos de Rio Claro, Valter, Tati, Verônica, Mazzi, Glalco, Érica, Givanildo, pessoas com quem posso sempre contar.

Aos professores Dr. Massanori Takaki e Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben, por ajudarem no desenvolvimento dos experimentos voltados a aplicações e por cederem espaço em seus laboratório para realização dos mesmos.

A Fapesp pelo apoio financeiro imprescindível para a realização desse trabalho

Aos meus pais que me proporcionam a oportunidade de seguir meus sonhos e que sempre me apoiam, obrigado PAI e MÃE, sem vocês eu nada seria, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de ser filho de vocês, meus heróis meus exemplos minha vida, são poucas as palavras pra expressar a minha gratidão, amo vocês.

A minha esposa, minha outra metade, pela compreensão com os finais de semanas e noites passados no laboratório, pela força, pelo amor e carinho que você me dá, TE AMO cada dia mais.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes 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 hidroxí, fosfato, carboxilato ou carboidrato (CAMEOTRA ; MAKKAR, 1998).

A diferença de polaridade entre as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas dos biossurfactantes possibilitam a distribuição dessas moléculas na interface de dois compostos imiscíveis, conferindo aos biossurfactantes 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).

1.1.1 Classificação e estrutura dos biossurfactantes

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

Além disso, os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com a sua massa molecular, havendo os de baixa massa molecular (glicolipídios, lipopeptídeos e fosfolipídios) e de alta massa molecular (biossurfactantes poliméricos e particulados), esta diferença 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. São constituídos basicamente por carboidratos ligados a ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos, que são unidos através

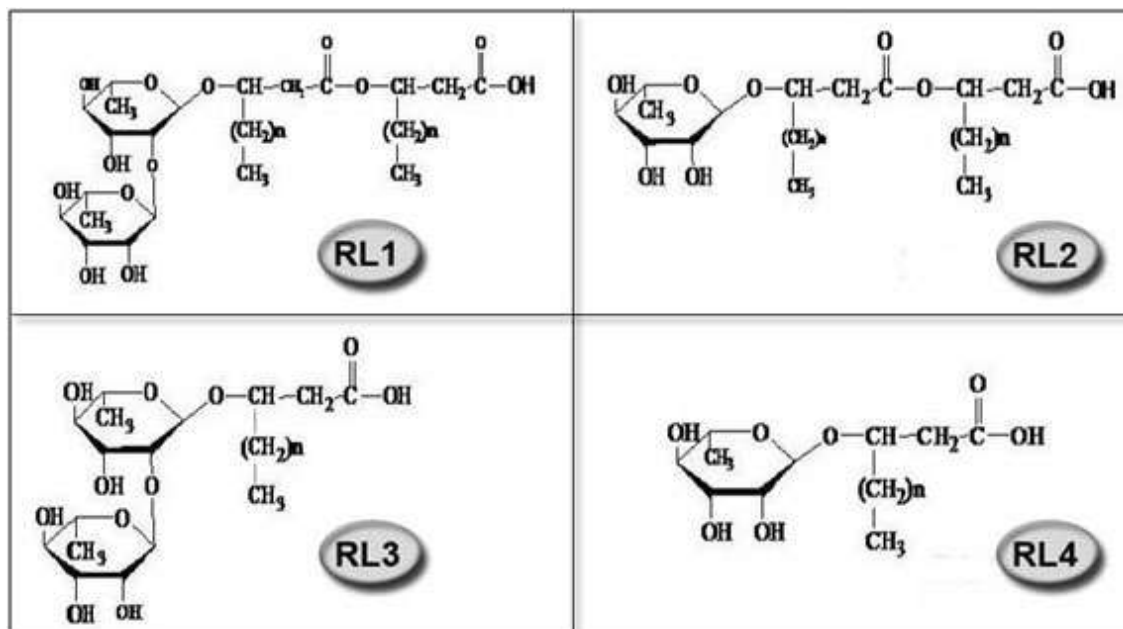
de uma ligação do tipo éter ou éster, dentro desse grupo os biossurfactantes mais conhecidos são: soforolipídios, trealoselipídios e os ramnolipídios.

Os glicolipídios sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* são denominados ramnolipídios, cuja porção hidrofílica é constituída por uma ou duas moléculas de ramnose e a região hidrofóbica por uma ou duas cadeias lipídicas (LANG; WAGNER, 1987). A capacidade de produção de ramnolipídios por bactérias desse gênero foi primeiramente descrita por Jarvis et al, (1949). Os biotensoativos produzidos por linhagens de *P. aeruginosa* 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 têm sido bem estudados e são reportados como uma mistura de espécies homólogas de RL1 (Rha2C10C10), RL2 (RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) e RL4 (RhaC10) (LANG e WAGNER, 1987). Os principais homólogos de ramnolipídios são os mono-ramnolipídios, que possuem uma unidade de ramnose e duas cadeias lipídicas (exemplo: Rha-C10-C10) e os di-ramnolipídios, que contem duas unidades de ramnose ligada a duas cadeias lipídicas (exemplo: RHA-Rha-C10-C10) (NITSCHKE et al, 2005b; SOBERON-CHAVEZ et al, 2005; MULLIGAN, 2005).

A Fig.1-1 mostra a estrutura dos quatro principais homólogos descritos de ramnolipídios sendo eles, RL1 (Rha2C10C10), RL2 (RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) e RL4 (RhaC10) (LANG ; WAGNER, 1987).

Figura 1-1: 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.



Fonte: Modificado de (LOVAGLIO, 2011).

Mais de 28 homólogos de ramnolipídios são descritos na literatura. Eles diferem na composição e no grau de insaturação dos ácidos graxos (DEZIEL et al, 1999; DEZIEL et al, 2000; SOBERÓN-CHÁVEZ 2005). A descoberta dessa grande variedade de homólogos esta diretamente ligada ao fato de que novas tecnologias vem sendo empregadas para a identificação dos ramnolipídios, tais como cromatografia líquida de alta resolução e espectrômetria de massa (LC-MS).

Na literatura há uma divergência, quando se trata de qual o tipo predominante de homólogo. 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 homólogos produzidos são di-ramnolipídios (DEZIEL et al, 2000, MATA-SANDOVAL 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).

1.2 BIOSSÍNTESE DOS BIOSSURFACTANTES

A estrutura anfipática dos biossurfactantes é constituída por uma porção hidrofóbica e uma região hidrofílica, em muitos casos a síntese destas porções 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 bactérias do genero *Pseudomonas* está relacionada com a primeira possibilidade citada, 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, 1985b). 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, os dois principais sistemas são os sistemas las e o rhl (GAMBELLO et al, 1993; PEARSON et al, 1994). Ochsner et al,(1994) utilizaram um mutante de *P. aeruginosa* incapaz de produzir ramnolipídios e que não apresentava atividade da homoserina lactona, afim de investigar possíveis genes responsáveis pela produção desse metabólito microbiano, para tal os pesquisadores inseriram fragmentos de DNA de linhagens produtoras de ramnolipídios nesse mutante, dessa forma

obtiveram um clone com a capacidade de produzir ramnolipídios e com a atividade da homoserina lactona restaurada. Ao verificar o fragmento do genoma responsável pela restauração da produção desse biossurfactante os autores descobriram um único quadro de leitura aberta correspondente ao gene *rhlR*, tal gene codifica uma proteína denominada RhlR, que se mostrou como um ativador transcricional, que regula positivamente a produção de ramnolipídios. Outro gene identificado foi o *rhlI* tal gene codifica a proteína RhlI, que se complexa com a proteína RhlR ativando a transcrição do autoindutor, N-butanol-L-homoserina lactona (PEARSON et al, 1994; WINSON et al, 1995).

Os complexos RhlR/RhlI e LasR/LasI são responsáveis pela modulação de 5 à 10% do genoma de *P. aeruginosa* (DEKIMPE ; DÉZIEL, 2009). Uma terceira molécula sinal, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona ou *Pseudomonas* quinolona sinal (PQS), é produzida por *P. aeruginosa* e atua como uma ponte adicional entre os sistemas de quorum sensing las e rhl. A proteína regulatória LasR é requerida para a biossíntese de PQS, enquanto RhlR promove a ativação desta molécula (WAGNER et al, 2008).

Inicialmente acreditava-se na existência de uma hierarquia, onde o sistema las seria o regulador mestre. Entretanto Duan e Surette (2007) relataram que o sistema que regula a síntese de ramnolipídios não é fixo, pois mesmo na ausência do sistema las, de acordo com as condições de cultivo, o sistema rhl pode regular genes controlados pelo sistema las. Dekimpe e Déziel (2009) também revisaram a proposta de que LasR seria o regulador mestre na hierarquia clássica de quorum sensing. Os resultados apresentados pelos autores mostraram que a atividade do sistema rhl não é anulada, e sim expressa tardiamente em mutantes lasR, permitindo, desta maneira, a expressão de fatores de virulência como ramnolipídios durante a fase estacionária de crescimento. Isso deixa evidente a complexidade do sistema que regula a biossíntese dos ramnolipídios.

1.3 APLICAÇÕES

A preocupação com o meio ambiente e indústria sustentável fizeram com que os biossurfactantes se tornassem um dos principais alvos das indústrias. Isso ocorre devido ao fato desses bioprodutos serem moléculas menos nocivas ao meio ambiente e robustas o bastante para aplicações industriais (MARCHANT ; BANAT, 2012).

Os biossurfactantes 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).

1.3.1 Função biológica dos biossurfactantes

Mesmo com todas as pesquisas que vem sendo realizadas na área de biossurfactantes, muitos dos papéis ambientais e ecológicos desses metabólitos para seus produtores ainda não estão bem elucidados. Porém, muitas funções foram atribuídas a esses bioprodutos ao longo de décadas de pesquisas. Uma das proposições é de que os biossurfactantes possam favorecer seus produtores na competição por nichos ecológicos. O crescimento de micro-organismos produtores de biossurfactantes pode ser favorecido em ambientes contaminados com hidrocarbonetos ou bastante oligotróficos (SOBERÓN-CHAVEZ et al, 2011).

Outro possível papel dos biossurfactantes para seus produtores é que, tais metabólitos favoreceriam a absorção e degradação de hidrocarbonetos, porém a produção dos surfactantes biológicos não esta necessariamente atrelada à degradação de hidrocarbonetos. Há ainda a possibilidade da produção de biossurfactantes estar relacionada a condições de estresse, onde ele serviria para a proteção das células microbianas (SOBERÓN-CHAVEZ et al, 2011).

Chrzanowski et al,(2012) relataram que os ramnolipídios podem estar associados a mobilidade bacteriana e a formação de biofilmes. Segundo os autores a mobilidade da bactéria *P. aeruginosa* esta relacionada à produção da proteína Pili IV, os autores dizem ainda que baixos índices de nitrogênio favorecem a síntese das estruturas necessárias para a locomoção bacteriana bem como a produção de ramnolipídios. O que sugere que *P. aeruginosa* produza esse biossurfactante e as estruturas necessárias para a movimentação, a fim de colonizar novos ambientes em busca de nitrogênio (CHRZANOWSKI et al,2012).

Outra função biológica atribuída aos ramnolipídios é a de solubilizar moléculas sinalizadoras produzidas por *P. aeruginosa* (PQS). Esse sinalizador é pouco solúvel em ambiente aquoso, tendo assim sua função comprometida em tais ambientes, porém quando secretado o ramnolipídio ajuda a solubilizar o PQS, aumentando consequentemente a bioatividade desse sinalizador (CALFEE et al, 2004).

1.3.2 Biossurfactantes na medicina

A aplicação mais bem conhecida dos ramnolipídios no setor de saúde consiste, na sua atividade antimicrobiana, tais metabólitos se mostraram eficazes contra uma ampla gama de micro-organismos, sendo eficientes contra bactérias Gram negativas e positivas, além de fungos filamentosos, porém não apresentam efeito significativo contra leveduras (VATSA et al, 2010).

Gomes e Nitschke. (2012) relataram que a surfactina e o ramnolipídio podem ser usados não só para remover o biofilme já estabelecido, como também prover um tratamento de superfície de maneira a modificar as propriedades superficiais. Este tipo de tratamento dificulta a formação posterior de filmes bacterianos gerados por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*, que são patógenos, normalmente associados a alimentos.

Ainda na área da saúde, os ramnolipídios vêm sendo aplicados como cicatrizantes de úlceras e queimaduras (PILJAC et al, 2008; STIPCEVIC et al, 2006). De acordo com Thanomsub et al, (2007) um dos homólogos produzido por *Pseudomonas aeruginosa* B189 apresentou atividade inibitória frente a células do câncer de mama.

Os ramnolipídios podem ainda provocar uma resposta positiva no sistema imunológico inato de células humanas e de animais, funcionando como um ativador. Este estímulo aliado às propriedades antimicrobianas desse biossurfactante, pode levar a uma aplicação terapêutica desses metabólitos em pessoas imunodeprimidas a fim de combater infecções (VATSA et al, 2010).

Há relatos de que alguns biossurfactantes da classe dos glicolipídios podem causar diferenciação em células leucêmicas humanas, que após serem tratadas com esses metabólitos se diferenciaram em monócitos e granulócitos (ISODA et al, 1997).

1.3.3 Aplicações na agroindústria

Dentro da agroindústria os biotensoativos também tem atraído atenção por demonstrarem atividade antimicrobiana e possuírem uma baixa toxicidade, o que permite seu uso frente a micro-organismos fito-patógenos. De acordo com Kim et al, (2000) soforolipídios e ramnolipídios, foram utilizados para combater os fungos causadores de manchas cinzas e moles em tomates e maçã.

Há relatos de que os ramnolipídios podem ser utilizados para a proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinérea*, pois inibem a germinação de esporos, bem

como o crescimento do micélio (VARNIER et al, 2009). Vatsa et al, (2010) relata em sua revisão a atividade antifúngica dos ramnolipídios contra diversos fungos patógenos de plantas, tais como *Botrytis sp*, *Rhizoctonia sp*, *Pythium sp*, *Phytophthora sp*. e *Plasmopara sp*.

Os ramnolipídios também demonstraram atividade contra zoósporos de patógenos de plantas, esse biossurfactante age lizando-os, através da interação do ramnolipídio com a membrana plasmática dos mesmos, o que leva a morte por extravasamento celular (VARNIER et al, 2009). Vale ressaltar que os ramnolipídios podem ser usados como fungicidas em plantas, tanto na forma pura como misturado ao caldo fermentado livre de células. A aplicação do produto não purificado leva a uma redução nos custos do tensoativo, tornando-o mais competitivo em relação aos antifúngicos comerciais (SHA et al, 2012).

Ainda relacionado à proteção de plantas contra seus patógenos, recentemente foi relatado que os ramnolipídios podem ativar o sistema imunológico de *Arabidopsis thaliana*. Quando em contato com esse biossurfactante a planta acumulou moléculas sinalizadoras e ativou os genes de defesa. Essa resposta participa da resistência contra bactérias hemibiotróficas e também oomicetos biotróficos, tais como *Pseudomonas syringae* e *Botrytis cinérea* (SANCHEZ et al, 2012).

Os ramnolipídios podem ainda atuar como inseticidas biológicos (KIM et al, 2011). Os homólogos de di-ramnolipídios $C_{32}H_{58}O_{13}$ e $C_{34}H_{62}O_{13}$ são relatados como os principais metabólitos a exercer atividade contra o pulgão da espécie *Myzus persicae*, uma concentração de 100 µg/ml de di-ramnolipídios se mostrou capaz de eliminar 100% dos pulgões, esses metabólitos atuaram principalmente na membrana da cutícula dos pulgões (KIM et al, 2011).

Recentemente os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas sp*. demonstraram potencial para ser utilizado contra *Rhyzopertha dominica*. Essa espécie de besouro é conhecida por ser uma praga que ataca grãos armazenados, causando prejuízos ao setor agrícola (AHMED et al, 2012). Tais metabólitos podem ainda exercer atividade anti-alimentar em larvas da borboleta *Spodoptera litura* (AHMED et al, 2012).

1.3.4 Biorremediação

O potencial para o uso dos biossurfactantes na área de biorremediação vem sendo estudado há mais de 20 anos (BANAT, 1995; LANG ; WAGNER, 1993). Tais

metabólitos microbianos podem ser empregados na limpeza de ambientes aquáticos e terrestres contaminados por petróleo, petroderivados e metais pesados (BANAT, 1995).

Costa et al, (2010) demonstrou o potencial dos ramnolipídios para a remoção de petróleo bruto de areias contaminadas. Nesse trabalho observou-se uma remoção de até 98% do petróleo, utilizando o ramnolipídio comercial JBR599 (Jeneil Biosurfactant Co., Saukville, USA) em sua concentração micelar crítica (CMC). Porém quando o ramnolipídio utilizado na lavagem da areia foi o L2-1 a remoção de óleo foi menor atingindo um índice de 69% na CMC. Foi observado um aumento de 15% na taxa de remoção quando a concentração utilizada ultrapassou em 5% a CMC. Segundo os autores dois mecanismos estão associados à remoção do petróleo, a mobilização que ocorre em concentrações inferiores a CMC e a solubilização que ocorre em concentrações superiores a CMC (COSTA et al, 2010).

Outros estudos realizados na área de biorremediação demonstraram que uma solução contendo 2% de ramnolipídios foi capaz de remover 74% do cobre contido em solo contaminados (VENKATESH ; VEDARAMAN, 2012). Wang e Mulligan, (2009), relataram que biossurfactantes podem ser úteis na remoção de arsênio de rejeitos da mineração. Os surfactantes microbianos podem ainda ser empregados na remoção de cromo (VI) tanto do solo como da água (ARA ; MULLIGAN, 2008).

Ainda na área de biorremediação os trabalhos de Awasthi et al, (1999) demonstraram que os surfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* auxiliaram a degradação de pesticidas por micro-organismos.

1.3.5 Outras aplicações

A indústria petrolífera faz uso dos biossurfactantes para a recuperação terciária do petróleo e para a recuperação de petróleo aprimorada por micro-organismos (MARCHANT ; BANAT, 2012).

Uma das principais aplicações doméstica dos surfactantes se dá na área de produtos de limpeza. Esse setor é dominado principalmente por compostos alquílicos sulfonatos, tais como, alquil benzeno linear sulfonato. Marchant e Banat, (2012) sugerem que alguns biossurfactantes podem substituir mesmo que parcialmente esses compostos alquílicos.

A formação e estabilização de nano partículas de óxido de níquel, zircônia e prata utilizando ramnolipídios também vêm sendo estudada (MULLIGAN, 2009; PALANISAMY; RAICHUR, 2009; GANESH et al, 2010). As nano partículas

construídas com o auxílio dos ramnolipídios apresentaram atividade antimicrobiana (GANESH et al, 2010).

1.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Nos últimos anos os biossurfactantes de origem microbiana têm recebido um grande interesse, devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e ampla gama de aplicações. Apesar das vantagens apresentadas, os biotensoativos não são amplamente utilizados comercialmente devido aos altos custos de produção, associados à baixa produtividade e ao uso de substratos caros. Três estratégias tem sido adotadas para tornar os custos do processo de produção mais baixo, dentre elas a utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo, o desenvolvimento de bioprocessos eficientes para produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo, ou ainda o desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante (MUKHERJEE et al, 2006).

1.4.1 Substratos alternativos

Estima-se que a matéria-prima seja responsável por até 30% dos custos totais de produção em muitos processos biotecnológicos (MUKHERJEE et al, 2006). O uso de fontes de nutrientes alternativas para a síntese de biossurfactantes pode reduzir o problema econômico da produção desses bioproduto, para isso poderiam ser utilizados subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. A adoção desses resíduos contribui para a redução da poluição ambiental, agrega valor aos mesmos, além de evitar o descarte indevido no meio ambiente. A indústria de óleo e gordura gera grandes quantidades de resíduos. Estes são provenientes tanto da extração como da utilização de óleos vegetais. Alguns estudos demonstraram que estas fontes de carbono alternativas podem ser utilizados como substratos por linhagens produtoras de ramnolipídios (BENINCASA et al, 2002; NITSCHKE et al, 2005a; COSTA et al, 2005; RAZA et al, 2007). Alguns autores relatam ainda o emprego de melaço de cana, resíduos da produção de queijo, batata e mandioca como fontes para a produção de biotensoativos (MUKHERJEE et al, 2006).

Óleos nativos do Brasil, como buriti, cupuaçu, maracujá, andiroba, castanha-do-Brasil e babaçu, também demonstraram potencial para a produção de biossurfactantes quando utilizados como fonte de carbono por *P. aeruginosa* LBI. A produção de ramnolipídios utilizando essas fontes de carbono variou de 2.9g/L (buriti)

até 9,9g/L (castanha-do-Brasil), todas as demais cultivos apresentaram uma produção acima de 6,0 g/L. (COSTA et al,2006).

Outra fonte alternativa para a produção de ramnolipídios é o glicerol. A geração de glicerol tem aumentado devido ao fato dele ser um subproduto da produção do biodiesel. No Brasil desde 2008 a adição de 2% de biodiesel ao diesel convencional é obrigatória, em 2013 essa porcentagem subiu para 5%, levando a uma produção indireta ainda maior deste insumo. Na União Europeia, companhias de produção de biodiesel enfrentam problemas em relação ao excesso de glicerol produzido, devido ao custo de descarte e ao baixo valor agregado desse subproduto. A utilização do glicerol como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como a produção de biosurfactante, reduziria o acúmulo desse subproduto e ainda favoreceria a produção de biosurfactantes (SILVA et al, 2010).

1.4.2 Fatores que influenciam a produção

Entre os parâmetros que influenciam o tipo e a quantidade de produto formado estão: a natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e parâmetros físicos e químicos, como aeração, agitação, temperatura e pH (FIECHTER, 1992; JOCHU-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) estimula a síntese de ramnolipídios, enquanto altas concentrações de cátions bivalentes, especialmente ferro, são inibitórias (GUERRA-SANTOS et al, 1986; VENKATA, RAMANA E 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 e GIBBS, 1989; VENKATA, RAMANA e KARANTH, 1989).

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 E 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, interferindo 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 6,0 e 6,5, já acima de 7,0, a produção caiu 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. DSM-2874 (SYLDATK et al, 1985a).

A produção de biossurfactantes por leveduras aumentou quando as taxas de agitação e aeração foram elevadas (YEH et al, 2006). Para Sheppard e Cooper, (1990) a transferência de oxigênio é um dos parâmetros chaves para a otimização e produção em grande escala de surfactin por *B. subtilis*.

A formação de espuma durante a produção de biossurfactante em biorreator é um dos grandes problemas enfrentados. Já que não se pode descartar o excesso de espuma, pois neste conteúdo há biossurfactante, células e nutrientes, há situações em que é necessária a interrupção da fermentação, antes do período estabelecido, 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.

1.4.3 Produção em biorreatores

Diversos autores têm adotado a fermentação em biorreatores para favorecer a produção de ramnolipídios. O controle rigoroso das condições físico-químicas da fermentação, permite a otimização da produção e o estabelecimento de métodos fermentativos eficientes, possibilitando a produção ramnolipídios em larga escala (LINHARDT et al, 1989; TRUMMLER et al, 2003; MÜLLER et al, 2010).

Linhardt et al (1989) relatou em seu trabalho uma produção de 46 g/L de ramnolipídios. Os experimentos desenvolvidos por ele foram conduzidos, em batelada, e a fonte de carbono utilizada foi óleo de milho. Müller et al (2010) utilizou o sistema no modo de batelada e alcançou 38 g/L de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* PAO1. Trummler et al, (2003) conseguiram uma produção de 45 g/L operando o sistema em batelada alimentada, a fonte de carbono foi óleo de canola.

Alguns autores relatam um decréscimo na produção desses biotensioativos quando o cultivo ocorre no modo batelada alimentada. Lovaglio et al, (2010) obteve

uma produção 16,9 g/L de ramnolipídios com cultivo em batelada, porém ao utilizar o sistema alimentado a produção caiu para 4g/L. Experimentos utilizando alimentação também apresentaram efeito negativo na produção de biossurfactantes por *Candida antarctica*, acarretando em uma redução de 45,5g/L para 28,0g/L (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000).

Por outro lado, há relatos em que a alimentação favorece a produção de ramnolipídios. Nos trabalhos desenvolvidos por Salwa et al, (2009), houve um aumento de mais de 45 vezes na produção (a produção passou de 0,17 para 8,06 g/L). esse acréscimo foi obtido apenas variando as estratégias fermentativas, a melhor condição foi onde a alimentação com fonte de nitrogênio foi interrompida no início da fase estacionária.

Dentre os trabalhos publicados, o desenvolvido por Müller et al, (2010), é um dos que apresentou a maior produção de ramnolipídios. Isso evidencia a qualidade do meio de cultura utilizado pelo autor (meio mineral livre de cálcio) e das condições físico-químicas adotadas, porém a fonte de carbono utilizada foi óleo de girassol, que possui alto valor agregado. Uma alternativa para tornar o processo mais viável economicamente é a substituição do óleo de girassol por substratos com custo reduzido, como resíduos do processamento de óleo.

Recentemente ZHU et al, (2012) utilizaram da cinética de fermentações acoplada a modelagem matemática em seus experimentos. A modelagem mostrou que a produção deveria continuar aumentando quando os dados experimentais não condiziam com o predito. Os autores decidiram empregar a alimentação para verificar se dessa maneira a produção continuaria aumentando, os resultados dos foram positivos, uma vez que a alimentação, acarretou em um aumento de 2,93 vezes na concentração do produto atingindo a concentração final de 70,56 g/L. Estes resultados comprovam que a alimentação pode ser uma estratégia empregada para aumentar a concentração final de ramnolipídios, tornando o processo mais rentável.

2 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

2.1 GERAIS

- Avaliar o efeito do cultivo em batelada alimentada na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1.

- Avaliar diferentes aplicações para os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1

2.1.1 Específicos

- Avaliar o potencial do óleo de soja, borra de óleo de milho, glicose e da mistura de óleo de soja e glicose como substratos para a produção de ramnolipídios;
- Avaliar a cinética de produção de ramnolipídios em biorreator;
- Avaliar diferentes técnicas de alimentação na produção de ramnolipídios (alimentação de por pulso unico e alimentação com vazão constante);
- Análisar os homólogos de ramnolipídios produzidos na fermentações utilizando a mistura das fontes de carbono hidrofóbica e hidrofílica;
- Verificar a influencia dos ramnolipídios no crescimento radicular das plantulas germinadas e na biomassa dessas palntulas;
- Avaliar a atividade inseticida dos ramnolipídios frente aos adultos e formas larvais de *Aedes aegypti*
- Verificar se os ramnolipídios produzidos anteriormente por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando óleo de girassol possuem capacidade de repelência frente a adultos de *Aedes aegypti*

3 CAPITULO I - PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS EM BIORREATOR
POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1



3.1 INTRODUÇÃO

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

A produção mundial de surfactantes em 2004 era de mais de 11 milhões de toneladas (entre surfactantes químicos e biológicos) (CAMEOTRA ; MAKKAR, 2004), o que faz com que o mercado de surfactantes seja bastante atrativo.

A maioria dos surfactantes sintéticos é derivado do petróleo, contudo na natureza são encontrados compostos com propriedades similares, os quais são denominados biossurfactantes. Esses compostos podem ser produzidos por diversos seres-vivos, dentre eles micro-organismos, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BANAT et al, 2000; DESAI; BANAT, 1997).

Esses biotensoativos possuem vantagens quando comparados aos sintéticos, sendo as principais delas sua diversidade estrutural, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e alta estabilidade em condições de alta salinidade e ampla faixa de pH (BENINCASA et al, 2008; LOVAGLIO et al, 2011). Além disso, os surfactantes biológicos podem ser sintetizados utilizando substratos de baixo custo, como subprodutos agroindustriais. O emprego de resíduos agrega valor aos mesmos, além de reduzir o impacto ambiental. (RAHMAN et al, 2003; WEI et al, 2003; 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).

No processo de produção a matéria prima corresponde a até 30% do valor agregado dos biotensoativos (MUKHERJEE et al, 2006), por esse motivo o emprego de resíduos, provenientes da indústria de alimentos, pode ajudar na redução dos custos de produção desses bioprodutos (NITSCHKE et al, 2005a).

De acordo com Mukherjee et al, (2006) três estratégias seriam importantes para ampliar a produção comercial de biossurfactantes, sendo elas, a utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo, o desenvolvimento de bioprocessos eficientes para produção e recuperação do produto, e o desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento na produção dos biossurfactantes.

Os biossurfactantes do tipo ramnolipídios, produzidos, principalmente, por bactérias do gênero *Pseudomonas* são considerados os mais promissores para produção industrial, devido as suas propriedades físico-químicas e biológicas (BENINCASA et al, 2004).

A produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 e *P. aeruginosa* PAO1 utilizando óleo de girassol como fonte de carbono foram de 33 e 38 g/L, respectivamente (LOVAGLIO, 2011; MÜLLER et al, 2010), entretanto a fonte de carbono utilizada nesses estudos não contribui para a redução dos custos de produção dos ramnolipídios. A utilização de fontes alternativas e de baixo custo, com o mesmo meio de cultivo utilizado pelos autores acima, seria uma importante estratégia para a redução do preço final desse bioproduto.

Em relação ao desenvolvimento de um bioprocesso eficiente e o desenvolvimento de linhagens mutantes descritas por Mukherjee et al, (2006). Como estratégias necessária para a implantação de um bioprocesso, o presente estudo propõe o desenvolvimento de protocolos de alimentação, com o intuito de aperfeiçoar o processo fermentativo, além de utilizar uma linhagem mutante que apresentou aumento de 70% na produção de ramnolipídios, quando comparada a bactéria selvagem (LOVAGLIO, 2011).

O presente capítulo visa avaliar a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1, em biorreator, utilizando o meio mineral livre de cálcio (MÜLLER et al, 2010) com diferentes fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas. Além disso, pretende-se aplicar o cultivo do micro-organismo em batelada alimentada, visando aumentar a produção desse composto.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo empregado nos experimentos realizados foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, o qual é proveniente de um banco de mutantes randômicos do Laboratório de Microbiologia Industrial – Depto de Bioquímica e Microbiologia – Unesp Rio Claro. Esse micro-organismo encontra-se acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% v/v, em freezer a -20°C.

3.2.2 Meios de cultura

3.2.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato

O meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato possui a seguinte constituição em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,1; NaNO_3 - 1,5; tampão fosfato 0,1mol/L 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; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 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.

Esse meio foi utilizado no cultivo do micro-organismo, o qual foi usado como inóculo para o biorreator, as fontes de carbono utilizadas para o crescimento microbiano foram de 50% da concentração utilizada no item posterior (3.2.2.2)

3.2.2.2 Meio Mineral livre de cálcio

Para a produção de ramnolipídios em biorreator utilizou-se o meio mineral livre de cálcio, composto por (g/L): K_2HPO_4 - 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 1,0; NaNO_3 - 15. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizada foram os mesmos descritos no item 3.2.2.1

As fontes de carbono empregadas em cada batelada estão descritas tabela 3-1.

Tabela 3-1: fontes de carbono utilizadas e suas concentrações

Fonte de carbono	Concentração
óleo de soja	250g/L
Borra de óleo de Milho	250g/L
Glicose	100g/L
Glicose + óleo de soja	50g/L e 234g/L respectivamente

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A massa de reagentes utilizada, nos meios descritos nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2, foi baseada no volume de solução aquosa, não considerando o volume da fonte de carbono. Quando o processo atingiu os tempos de 20, 40, 70 e 120 horas foram adicionados ao reator 1 mL/ L da solução de elementos traço (item 3.2.2.1).

3.2.2.3 Definição da concentração de glicose a ser utilizada nos ensaios em biorreator

Inicialmente a concentração de glicose a ser empregada para a produção de ramnolipídios seria de 250g/L, porém observou-se dificuldade no crescimento bacteriano, provavelmente devido à pressão osmótica do meio de cultura contendo tal concentração de açúcar. Frente a isso foram realizados cultivos em frascos, a fim de determinar qual a melhor concentração de glicose para o crescimento bacteriano e produção de ramnolipídios.

3.2.3 Ensaios em frascos

Dois grupos experimentais diferentes foram estabelecidos. Em um deles, manteve-se a mesma razão carbono nitrogênio que o cultivo com óleo de soja como fonte de carbono ($C/N = 76,8g/g$), para tanto se alterou a concentração de nitrogênio para cada concentração de glicose avaliada. No segundo grupo, manteve-se a concentração de nitrogênio (1,5 g/L), modificando apenas a proporção C/N a ser utilizada. Para os experimentos em frascos o meio de cultura base foi o meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato descrito no item (3.2.2.1).

As concentrações de nitrogênio, glicose e a razão C/N avaliadas em ambos os grupos experimentais estão descritas na Tabela 3-2.

Tabela 3-2: Concentração de glicose, nitrogênio e proporção C/N avaliadas nos experimentos em frasco.

Grupo experimental 1		
Concentração de glicose (g/L)	Concentração de Nitrogênio(g/L)	Razão C/N
100	3,12	76,8
150	4,68	76,8
200	6,24	76,8
250	7,80	76,8
Grupo experimental 2		
100	1,50	160
150	1,50	240
200	1,50	320
250	1,50	400

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.2.4 Condições de cultivo

3.2.4.1 Preparo do Inóculo

O micro-organismo foi pré-cultivado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de caldo nutriente e 100 µL da cultura estoque da linhagem a *P. aeruginosa* LBI 2A1. A incubação foi feita em mesa agitadora, durante 24 horas à 37°C e 120 rpm. Em seguida 5 mL desse pré-cultivo foi transferido para frascos de 500 mL com 100 mL de meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato e esse frasco foi incubado por 48 horas à 37°C e 130 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação da fase aquosa resultando em uma densidade ótica ($D.O_{580\text{ nm}}$) inicial de 0,1.

3.2.4.2 Experimentos Biorreator

As fermentações foram realizadas em reator de 13L (Infors HT – Suíça), equipado com sensores para controle de temperatura, pH, pO₂ e espuma. O volume de fase aquosa era de 4,0 L à qual se adicionou as concentrações descritas no item 3.2.2.2.2 da fonte de carbono avaliada (tab. 3-1). Os parâmetros físico-químicos adotados foram: aeração – 2,0 L/min; temperatura – 37 °C; pH – $6,8 \pm 0,2$; a pO₂ foi mantida acima de 5%, para tal variou-se a agitação de 300 a 900 rpm ; o volume de espuma formada foi controlado através do antiespumante Contraspum A4050 (Zschimmer & Schwarz GmbH & Co. KG), o pH foi controlado utilizando H₃PO₄ 4M e NaOH 4M.

3.2.4.2.1 Experimento utilizando a mistura de glicose e óleo de soja como fonte de carbono

Após os experimentos realizados utilizando óleo de soja e glicose, separadamente, como fonte de carbono, avaliou-se óleo de soja e glicose concomitantemente. As concentrações utilizadas foram definidas analisando os cultivos acima citados.

A concentração de óleo foi definida subtraindo o valor de óleo residual (16,5g) da concentração inicial (250g/L). Já a concentração de glicose foi definida avaliando a quantidade de glicose utilizada pelo micro-organismo até que a biomassa máxima fosse atingida, e foi estabelecida a concentração de 50g/L de glicose.

3.2.4.3 Cultivos realizados no modo batelada alimentada

3.2.4.3.1 Alimentação por pulso único

Nessa batelada o meio de cultura empregado foi o mesmo descrito no item 3.2.2.2, a fonte de carbono foi óleo de soja, a alimentação ocorreu com 58 horas de

cultivo e foram adicionados 23,85g/L de óleo de soja (o volume de óleo adicionado foi calculado com base no volume da fase aquosa do reator).

3.2.4.3.2 Alimentação com vazão contínua

Após analisar a batelada utilizando óleo de soja como fonte de carbono, calculou-se a velocidade máxima de consumo de óleo de soja no intervalo de tempo em que se observou o μ_p máximo, então a batelada alimentada foi realizada com uma vazão igual ao μ_s máximo, com o intuito de manter a máxima velocidade específica de produção, a alimentação foi iniciada com 60h de processo e teve duração de 8 horas, a vazão utilizada foi de 0,096 ml/min (5,3g de óleo de soja a cada hora de alimentação).

3.2.5 Métodos analíticos

3.2.5.1 Processamento das amostras

Foram retiradas amostras de 20 mL, que foram divididas em duas de 10 mL e n-hexano foi misturado na proporção de 1:1. As amostras foram agitadas por 1 minuto, em seguida centrifugadas à 1770 vezes g, 4°C e 30 min para que houvesse a separação de fases, células / fase aquosa / n-hexano + óleo.

3.2.6 Avaliação da produção de Ramnolipídios

3.2.6.1 Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com o objetivo de verificar a produção de ramnolipídios antes de prosseguir às 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. Foram então aplicados 10 μ L dos extratos obtidos a partir do caldo livre de células em diferentes tempos.

3.2.6.2 Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC

3.2.6.2.1 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 0,04 mol/L e Trietilamina 0,02 mol/L, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um banho seco (Thermomixer comfort, Eppendorf AG).

3.2.6.2.2 HPLC

As análises foram feitas com um equipamento HPLC (Shimatzu) acoplado a um detector UV como descrito por (MÜLLER et al, 2010).

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 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 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.

3.2.7 Determinação da biomassa microbiana

Após a separação das 3 fases (item 3.2.5.1) o precipitado de células foi dissolvido em NaCl 0,85% (v/v) (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 1770 vezes g, 4°C e 30 min. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantido em estufa à 100°C até atingir peso constante.

3.2.8 Determinação do óleo residual

A fase de n-hexano retirada e adicionada a um tubo previamente pesado, esse material foi colocado para secar em capela, a temperatura ambiente. Para que ocorresse a evaporação do solvente, após o peso do tubo estabilizar subtraiu-se o peso quantificado previamente a fim de quantificar apenas o óleo extraído.

3.2.9 Determinação da borra de óleo de milho residual

No experimento utilizando borra de óleo de milho (BOM) como fonte de carbono, a quantidade residual desse substrato foi determinada de maneira similar a determinação do óleo residual descrita no item 3.2.8 Porém a fim de correlacionar a concentração total da borra de óleo de milho com a sua fração solúvel em n-hexano foram preparadas 3 soluções aquosas diferentes contendo 250, 125 e 75g/L de BOM, tais soluções foram submetidas ao processamento descrito no item 3.2.8 e obteve-se uma correlação entre a concentração final de BOM e a sua fração solúvel em n-hexano de 2,5 portanto os valores obtido após a evaporação do solvente foram multiplicados por 2,5.

3.2.10 Determinação da glicose residual

A glicose residual foi determinada em HPLC como descrito por McGinley e Mott, (2008) com pequenas modificações. Utilizou-se a coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) da Phenomenex, injetou-se 5 µL de cada amostra, esse material foi previamente filtrado a 0,20 µm, e a vazão de 0,6 mL/min. As análises foram feitas a 65°C e a fase móvel H₂SO₄ (0,0025 mol/L), o tempo de corrida foi de 15 min e a detecção foi realizada por índice de refração.

3.2.11 Quantificação de nitrogênio

A concentração de nitrato foi determinada a partir do caldo livre de células, utilizou-se UV, de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Clesceri et al, (1989).

3.2.12 Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios por Espectrometria de Massa

Para a análise dos homólogos em espectrômetro de massas, produziu-se ramnolipídios utilizando óleo de soja e glicose concomitantemente como fontes de carbono. As amostras utilizadas para análise correspondem aos tempos 38, 86 e 158 horas de cultivo

3.2.12.1 Espectrometria de Massa – ESI-MS

As caracterizações foram feitas em um espectrômetro de massa utilizando Ionização por Eletrospray (ESI -*Electrospray ionization*), o analisador de massa utilizado era do tipo Quadrupolo - Tempo de Vôo (Q-ToF - *Quadrupole Time-of-Flight*) (Micromass, Manchester, UK). O equipamento foi calibrado com H₃PO₄, as amostras foram diluídas individualmente em uma solução de metanol/água (1:1) + 0,1% de hidróxido de amônio, para que houvesse a desprotonação das moléculas de ramnolipídios, e injetadas diretamente

na fonte de ionização ESI através de uma bomba-seringa com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os espectros foram adquiridos em modo negativo em uma faixa de massas de 100 a 1.500 m/z . As condições de operação utilizadas foram: voltagem do capilar: 3,5 kV; voltagem do cone: 35 V; voltagem do cone extrator: 4 V; temperatura de dessolvatação: 100°C; temperatura da fonte: 100 °C. Para os experimentos de MS/MS o gás utilizado foi Argônio e a energia de colisão: 25eV.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao término de cada bioprocessos realizou-se uma cromatografia em camada delgada (CCD) a fim de verificar a produção de mono e di-ramnolipídios, para dar continuidade ao processo de quantificação, a Figura 3-1 mostra uma CCD, referente à batelada utilizando 250g/L de óleo de Soja como fonte de carbono.

Figura 3-1: Cromatografia em camada delgada evidenciando a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em cultivo em batelada utilizando 250g/L de óleo de Soja como fonte de carbono.



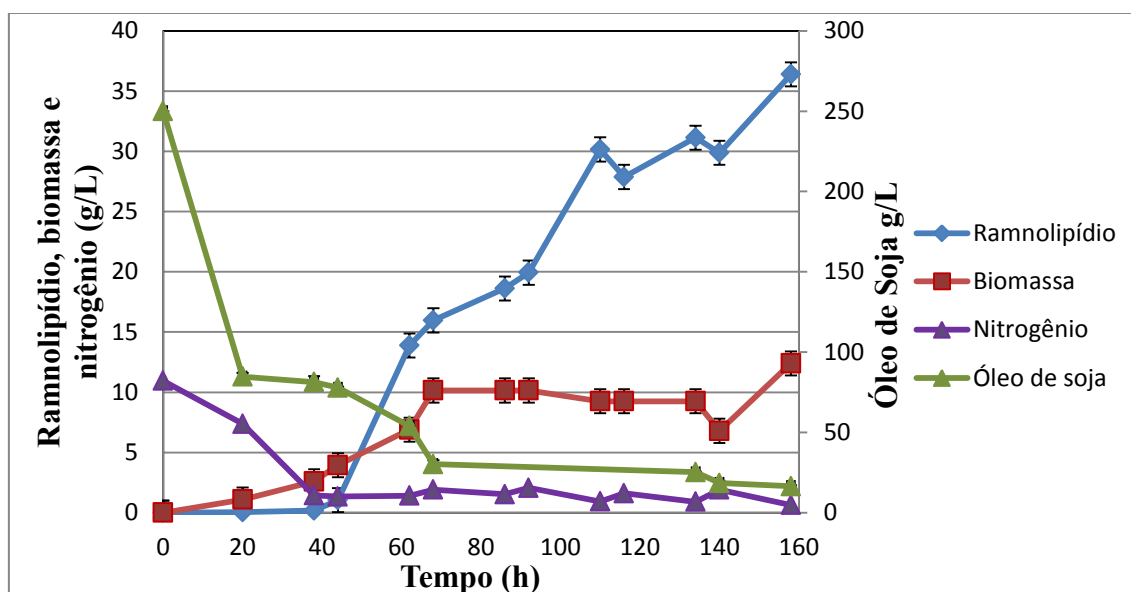
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

A figura 3-1 demonstra a CCD de um dos bioprocessos realizados, os números de 1 até 12 equivalem as amostras retiradas ao longo do cultivo. O J é o padrão do ramnolipídios comercial JBR599, e a amostra identificada como RHL3 é o padrão dos di-Ramnolipídios. Pode-se verificar que em todos os tempos ocorreu a produção de mono e di-ramnolipídios nesse cultivo, pois temos pontos correspondentes a esse bioproduto em todos os tempos verificados.

3.3.1 Bioprocesso 1: produção de ramnolipídios utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte de carbono

A figura 3-2 apresenta o perfil de crescimento, consumo de óleo, consumo de nitrogênio e produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando óleo de soja como fonte de carbono.

Figura 3-2: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte de carbono.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

O micro-organismo cresceu até 68 horas de cultivo, nesse período a biomassa atingida foi de 10 g/L, a bactéria entrou então na fase estacionária. Após 134 horas, foi possível observar uma queda na massa seca, porém em seguida a bactéria volta a crescer, atingindo a biomassa máxima de 12,4 g/L no tempo de 158h.

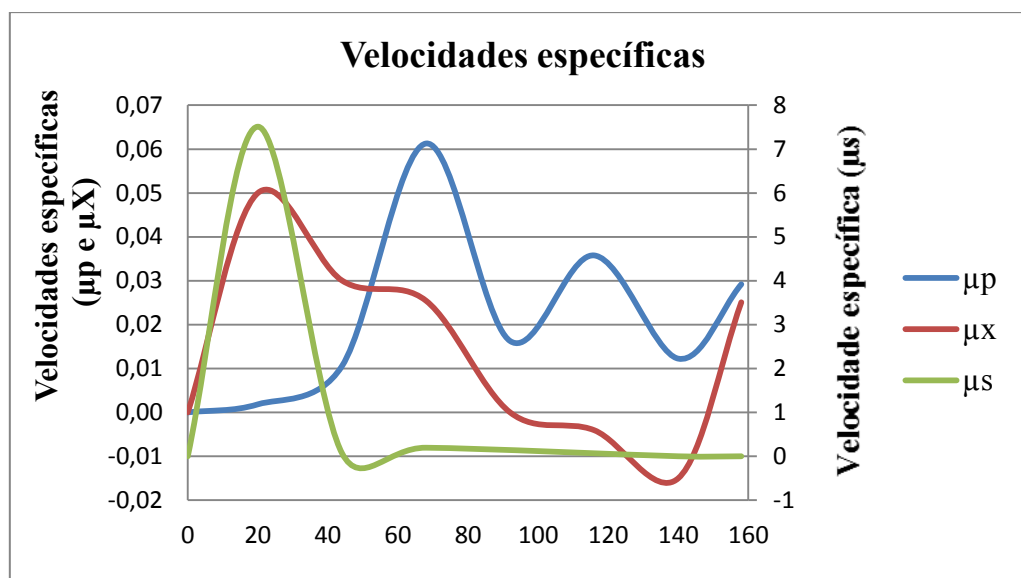
A produção de ramnolipídios se iniciou com 38 horas de cultivo, após a concentração de nitrogênio cair. A produção continuou aumentando até o final do processo, atingindo 36,4 g/L. A concentração máxima obtida foi ligeiramente maior que a observada por Lovaglio, (2011) cuja produção foi de 33 g/L de ramnolipídios e se manteve ainda próxima a produção alcançada por Müller et al, (2010) que foi de 38g/L. Deve-se ressaltar ainda que a fonte de carbono utilizada por esses autores foi o óleo de girassol, uma fonte de carbono mais cara que a utilizada no presente trabalho.

O maior consumo da fonte de carbono ocorreu nas primeiras 20 horas do processo, após esse período houve desaceleração na assimilação e ao término da batelada havia 16,5 g/L de óleo residual. A quantidade de substrato residual foi inferior ao encontrado por Lovaglio, (2011), cujos valores foram de aproximadamente 50g/L de óleo de girassol. Isso indica que há maior consumo de óleo de soja para a produção de concentrações similares de ramnolipídios, porém, vale ressaltar que o óleo de soja é mais barato que o óleo de girassol (GUNSTONE, 2012), o que contribui para a redução do custo final do produto, além disso, a menor concentração de óleo ao término do processo pode ajudar na purificação do bioproduto.

3.3.1.1 Velocidades específicas

Foram analisadas as velocidades específicas de formação de biomassa, produto e consumo de substrato, μ_x , μ_p e μ_s , respectivamente. Os resultados podem ser observados na Fig. 3-3.

Figura 3-3: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando óleo de soja como fonte de carbono.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_x) foi de 0,05 h⁻¹, valor inferior ao relatado por Lovaglio, (2011) que obteve 0,09 h⁻¹, demonstrando que a bactéria *P. aeruginosa* LBI 2A1 pode utilizar com mais facilidade o óleo de girassol que o de óleo de soja para o crescimento.

O μ_s apresentou valor máximo em 20 horas, atingindo uma velocidade específica de consumo de $7,5 \text{ h}^{-1}$, em seguida houve queda na velocidade de consumo. Com relação à velocidade específica de produção, o máximo atingido foi de $0,06 \text{ h}^{-1}$, em 68 horas.

No tempo de 20 horas as curvas μ_x e μ_s apresentam um pico, indicando que a fonte de carbono, dentre os fatores analisados, esta sendo direcionada principalmente para a formação de biomassa.

A velocidade específica de formação do produto começa a aumentar a partir de 20 horas, quando a produção de ramnolipídios se inicia, neste período as curvas de μ_x e μ_p não coincidem, pois, havia crescimento celular, mas não produção do metabólito de interesse. Porém pode-se visualizar na figura 3-2 que no período de 20 a 62 horas há produção de ramnolipídios ainda durante a fase exponencial de crescimento. O perfil observado sugere que nas condições em que o processo foi conduzido a produção de ramnolipídios se comporta como um metabólito parcialmente associado ao crescimento.

Contudo ainda não está bem estabelecido se os ramnolipídios são metabólitos produzidos associados ou não ao crescimento do micro-organismo. Müller e Hausmann, (2011) afirmam que esse bioproduto é um metabólito secundário típico, por outro lado Silva et al, (2010) relatam que a produção desses biotenssoativos ocorre associada ao crescimento.

No presente estudo há períodos em que o crescimento ocorre sem que haja produção e outros em que o aumento da biomassa ocorre concomitante à formação do produto. Tais observações corroboram com os dados de Lovaglio, (2011) e Zhu et al, (2012) que consideraram os ramnolipídios como metabólitos parcialmente associados ao crescimento.

É provável que a fonte de carbono, a proporção carbono/nitrogênio, as condições de cultivo de maneira geral, além da função fisiológica dos ramnolipídios em relação à espécie produtora, influenciem nos perfis de produção, fazendo com que sejam classificados como metabólitos associados ao crescimento, não associados ou parcialmente associados.

3.3.1.2 Fatores de conversão

Foram avaliados também os fatores de conversão $Y_{x/s}$ (formação de biomassa em função do substrato), Y_p/s (formação do produto em relação ao substrato) e Y_p/x

(formação do produto em relação à biomassa). Os valores máximos desses fatores de conversão podem se visualizados na tabela 3-3.

Tabela 3-3: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, Y_p/s e Y_p/x , utilizando óleo de soja como fonte de carbono

Fatores de conversão (g/g)		Tempo(h)
$Y_{x/s}$	2,8	140-158
Y_p/s	3,2	140-158
Y_p/x	2,4	44-68

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

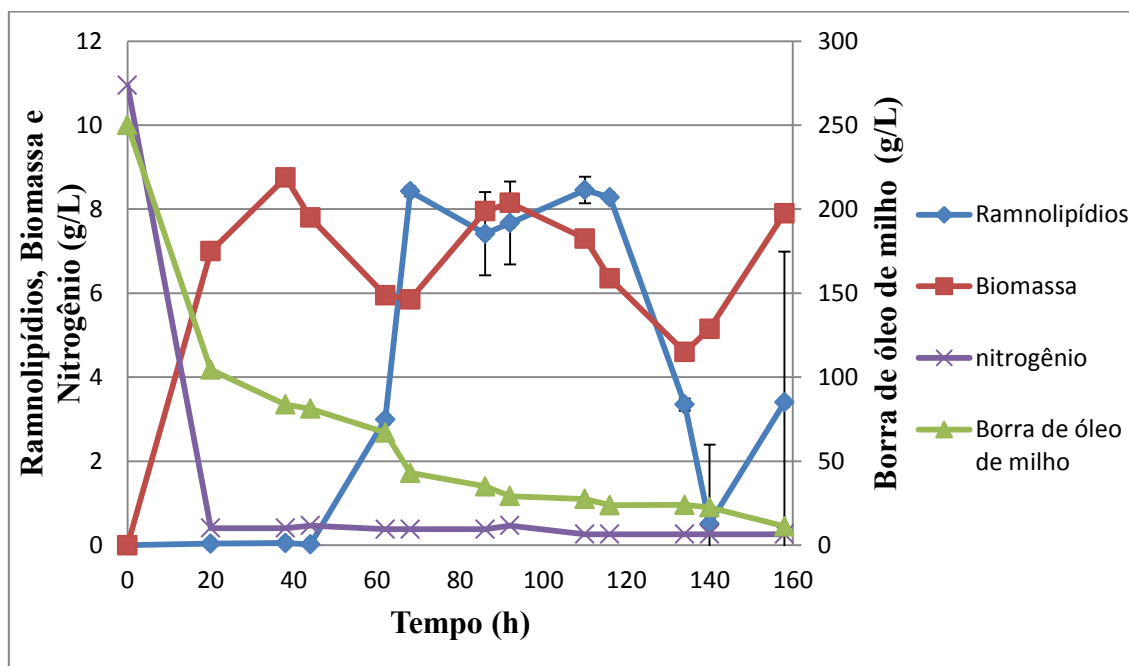
A produtividade máxima foi de 0,23g/L.h ao termino do cultivo, valor ligeiramente maior que a alcançada por Lovaglio, (2011), que obteve 0,20g/L.h. Este resultado indica que a mudança da fonte de carbono foi positiva para a produção de ramnolipídios.

Os fatores apresentados serão utilizados para a comparação entre essa e as demais fermentações uma vez que a produtividade e o rendimento são primordiais para o estabelecimento de um processo rentável na indústria.

3.3.2 Bioprocesso 2: produção de ramnolipídios utilizando 250g/L de borra de óleo de milho como fonte de carbono

A figura 3-4 apresenta o crescimento microbiano, o consumo da fonte de carbono e a produção de ramnolipídios utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono.

Figura 3-4: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato e Nitrogênio (g/L) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando 250g/L de Borra de óleo de milho como fonte de carbono



Fonte: elaborado pelo autor.

O crescimento microbiano utilizando Borra de óleo de milho (BOM) como fonte de carbono foi mais acentuado de 0 até 38 horas, após esse período a biomassa oscilou entre 7,9 a 4,6 g/L, o crescimento microbiano máximo foi de 8,75g/L em 38 horas de cultivo.

O consumo da fonte de carbono BOM foi maior nas primeiras 20h e se estendeu até o final do processo, no tempo final de produção a concentração de borra de óleo de milho residual foi de apenas 11,25g/L.

O consumo de nitrogênio se deu de maneira mais rápida quando comparado ao bioprocessamento anterior cuja fonte de carbono foi óleo de soja, diferente do observado na batelada anterior o nitrogênio é consumido nas primeiras 20 horas, e após a depressão na concentração de nitrogênio, a produção de ramnolipídios demora ainda 24h para ser expressiva.

A produção de ramnolipídios se iniciou com 20 h de processo sendo nesse período 0,03 g/L, porém essa produção só passa a ser expressiva após 44 h, a produção máxima ocorreu em 110 h de processo e atingiu 8,45 g/L, após esse estágio observa-se uma redução na concentração de ramnolipídios no meio. A segunda maior produção nesse processo foi de 8,42 g/L em 68h, porém a diferença entre a produção nos tempos

de 110 e 68h não foi estatisticamente significativa ($p=0,85$), por tanto o ideal é finalizar a produção com 68 horas de cultivo, contribuindo para a redução do custo de produção.

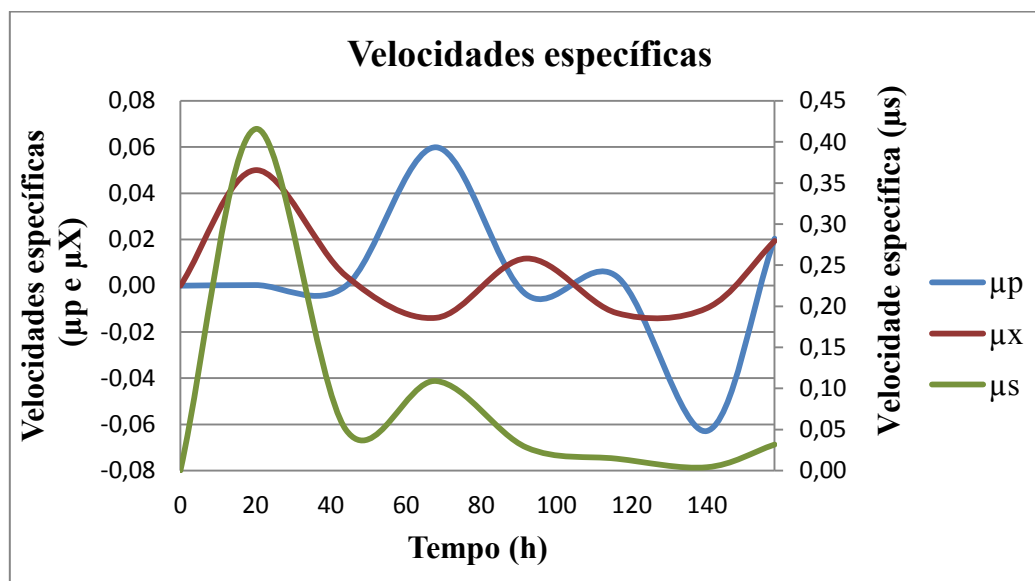
Diversos resíduos são empregados para a produção de ramnolipídios dentre eles óleo de fritura usado (ZHU et al, 2007), água de manipueira (COSTA et al, 2010) e borra de óleo de soja (BENINCASA ; ACCORSINI, 2008). Benincasa e Accorsini, (2007) obtiveram uma concentração de 7,3g/L de ramnolipídios, sendo inferior à atingida no presente estudo, o que demonstra que a produção desse bioproduto usando BOM é satisfatória, sob a óptica do baixo custo da fonte de carbono. Além disso, o menor tempo de cultivo observado neste trabalho, também contribui para a valorização da borra, como uma possível fonte de carbono para a síntese de ramnolipídios.

Os cultivos utilizando óleo de soja como fonte de carbono e BOM, apresentam divergências com relação aos perfis de produção, no primeiro a produção de ramnolipídios se inicia com 20 horas de cultivo e se estende até o final do processo, já no segundo caso, a produção também tem início com vinte horas, porém atinge seu ápice com 68 horas se mantendo praticamente estável até 120h. Com relação à biomassa, o bioprocesso utilizando óleo de soja apresentou uma fase logarítmica até 68h entrando a partir desse ponto na fase estacionária, entretanto quando a BOM foi empregada o micro-organismo cresceu nas primeiras 20 horas apresentando alternância de quedas e aumento na biomassa após esse momento. Já as curvas de consumo foram bastante similares.

3.3.2.1 Velocidades específicas

Afim de melhor entender a cinética da produção de ramnolipídios foram calculados os valores de μ_x , μ_s e μ_p ao longo do tempo, os resultados podem ser visualizados na figura 3-5.

Figura 3-5: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando Borra de óleo de Milho como fonte de carbono.



Fonte: dados obtidos no presente estudo.

O μ_p máximo foi de $0,06 \text{ h}^{-1}$ no tempo de 68h, o mesmo foi observado no cultivo utilizando óleo de soja, onde a concentração do produto era superior, entretanto a biomassa também era proporcionalmente maior do que no experimento empregando BOM.

O principal pico de μ_s é coincidente como o pico máximo de μ_x , tais picos se dão no intervalo de tempo de 0 a 40h, o que demonstra que nesse período dentre os fatores avaliados (crescimento e produção de ramnolipídios) o fluxo de carbono estava sendo empregado principalmente no crescimento bacteriano.

O segundo pico de μ_s acontece no tempo de 68h sendo concomitante ao pico máximo de μ_p , portanto nesse momento o substrato utilizado passa a ser empregado principalmente na produção de ramnolipídios.

Na figura 3-5 observa-se que μ_x e μ_p não possuem regiões coincidentes, na figura 3-4 pode-se visualizar que não há produção de ramnolipídios durante a fase estacionária de crescimento, mostrando que quando a borra de óleo de milho é empregada como fonte de carbono o ramnolipídio se comporta como um metabólito secundário, sendo produzido de maneira não associada ao crescimento microbiano, concordando com Müller e Hausmann, (2011).

A produção de ramnolipídios apresenta diferentes perfis, quando se utiliza óleo de soja como fonte de carbono, esse metabólito se comporta como parcialmente associado ao crescimento, porém no cultivo empregando BOM assume um perfil de metabólito secundário, essa mudança pode ocorrer, pois os fatores ambientais influenciam nos sistemas de quorum-sensing que regulam a síntese de ramnolipídios (DUAN ; SURETTE , 2007). Nesse trabalho os autores verificaram o comportamento dos sistemas de quorum-sensing Las e Rhl sob 46 diferentes condições de crescimento, e chegaram a conclusão de que dependendo dos fatores ambientais, o tempo e a intensidade de expressão dos genes presentes nesses sistemas de quorum-sensing varia.

Os resultados obtidos por esses autores, e o observado no presente trabalho, corroboram com a hipótese levantada previamente de as condições de cultivo influenciam no perfil de produção dos ramnolipídios.

3.3.2.2 Fatores de conversão

Para comparar os cultivos realizados foram calculados os fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$. Os valores máximos desses fatores de conversão podem se visualizados na Tabela.3-4.

Tabela 3-4: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono.

Fatores de conversão (g/g)		Tempo(h)
$Y_{x/s}$ máximo	0,42	68-92
$Y_{p/s}$ máximo	0,55	44-68
$Y_{p/x}$ máximo	6,47	116-140

Fonte: elaborada pelo autor.

O rendimento produto/ substrato máximo ($Y_{p/s}$) foi de aproximadamente 0,55 g/g, no período de 44 a 68 horas de cultivo. Já na batelada utilizando óleo de soja como única fonte de carbono o $Y_{p/s}$ foi de 3.2 g/g, sendo superior ao observado utilizando BOM.

O fator $Y_{x/s}$ atingiu 0,42 g/g no intervalo de tempo de 68 a 92h, em relação ao rendimento $Y_{p/x}$ o valor máximo foi 6,47g/g e ocorreu entre 116 e 140 horas, tal

rendimento foi superior ao observado no experimento anterior, pois a biomassa utilizando BOM foi inferior à obtida com óleo de soja.

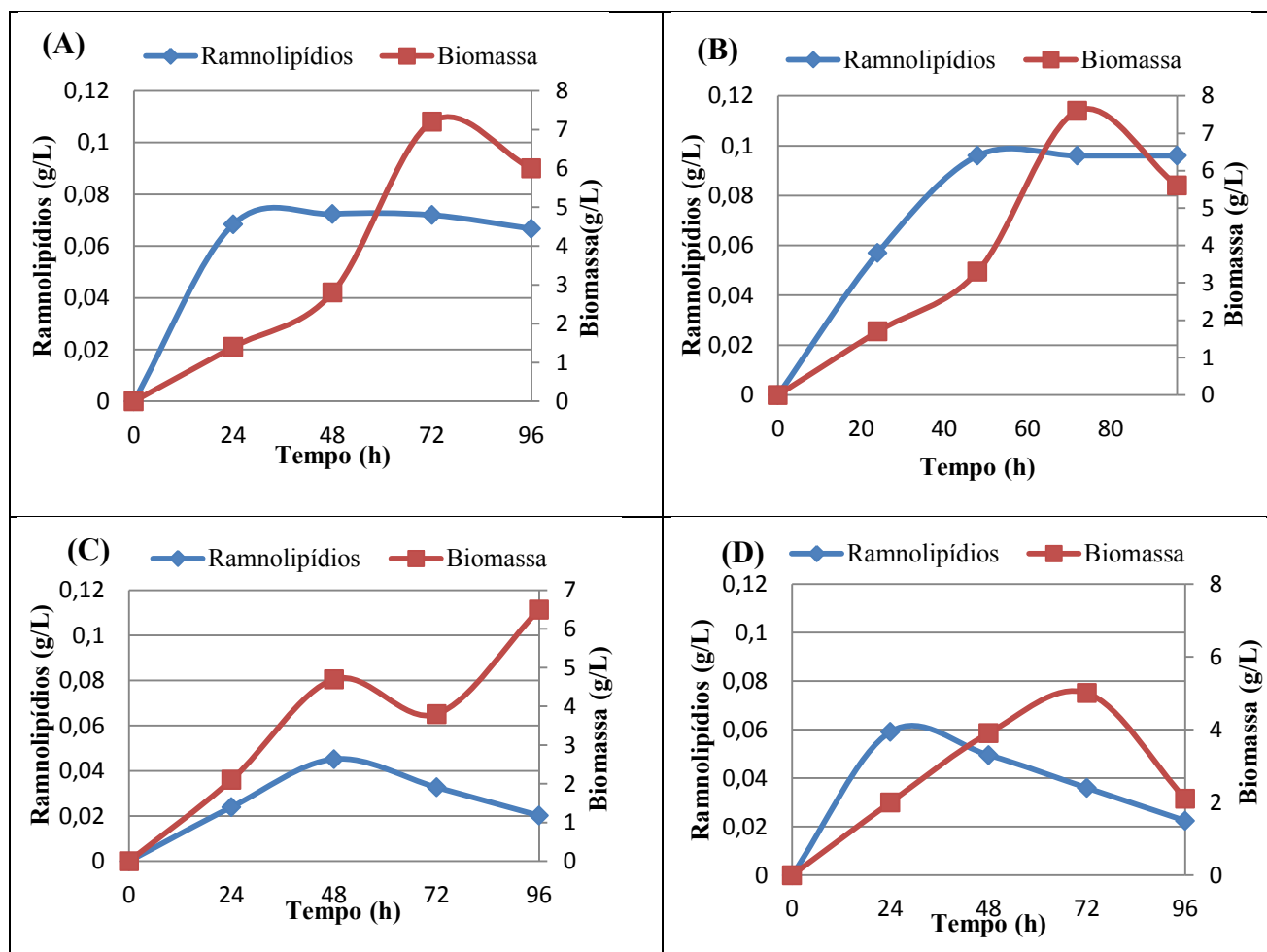
A produtividade foi de 0,124 g/L.h após 68h de processo, tal valor é inferior ao encontrado por Lovaglio, (2011), (0,20 g/L.h) e ao atingido, neste estudo, utilizando óleo de soja (0,23 g/L.h),

3.3.3 Bioprocesso 3: produção de ramnolipídios utilizando glicose como fonte de carbono

3.3.3.1 Ensaios em frascos

A seguir serão apresentados os resultados dos cultivos realizados em frascos, a fim de determinar a melhor concentração de glicose para a produção de ramnolipídios. A Fig. 3-6 mostra a produção de ramnolipídios em frascos mantendo a mesma razão de carbono nitrogênio do cultivo realizado utilizando óleo de soja como fonte de carbono (C/N 76,8).

Figura 3-6: Produção de ramnolipídios mantendo a mesma proporção de carbono e nitrogênio do cultivo utilizando óleo de soja, (A) 100g/L, (B) 150g/L, (C) 200g/L e (D) 250g/L de glicose

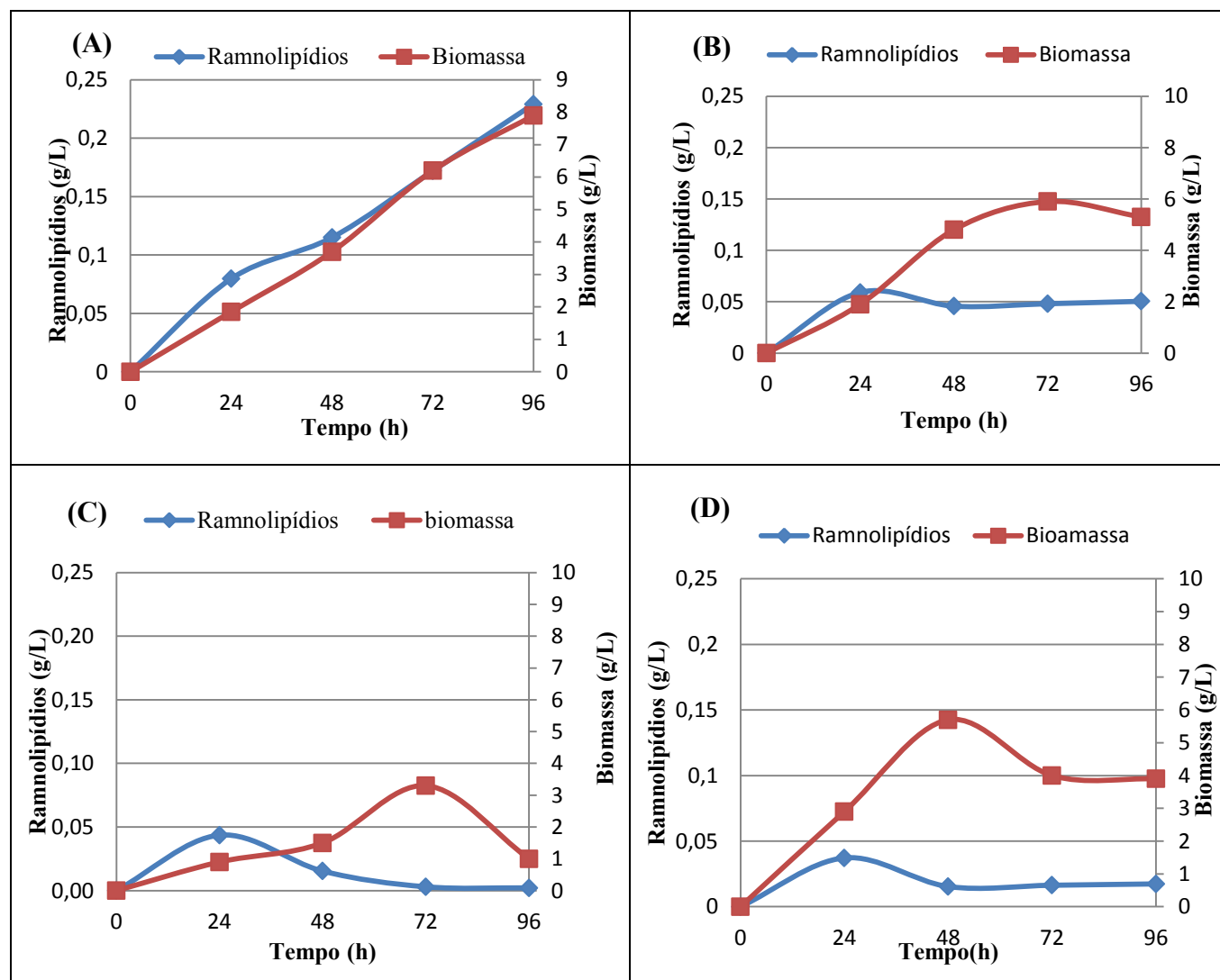


Fonte: dados obtidos no presente estudo.

Nos cultivos apresentados na Fig. 3-6, onde a proporção C/N foi mantida em 76,8, a concentração de glicose que propiciou o maior crescimento microbiano foi 150g/L, a biomassa obtida foi de 7,6g/L. Tal concentração de glicose favoreceu também a produção de ramnolipídios, que atingiu aproximadamente 0,1 g/L de bioproduto. Os demais cultivos avaliados nessas condições de C/N apresentaram produção inferior a 0,7 g/L.

A Fig. 3-7 apresenta os perfis de produção de ramnolipídios em frascos mantendo a concentração de nitrato em 1,5 g/L.

Figura 3-7: Produção de ramnolipídios mantendo a concentração de nitrato em 1,5g/L de NaNO₃ e variando a concentração de glicose, (A) 100g/L, (B) 150g/L, (C) 200g/L e (D) 250g/L de glicose



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Já nos cultivos em que a concentração de nitrogênio foi mantida de acordo com o meio de cultura original, e, portanto, variou-se a razão C/N em cada concentração de glicose avaliada, o maior crescimento foi de aproximadamente 8g/L e a melhor produção atingiu 0,23g/L de ramnolipídios, tais resultados foram obtidos com 100g/L de glicose como fonte de carbono e C/N igual a 160.

As concentrações maiores de glicose prejudicaram tanto o crescimento como a síntese de ramnolipídios, esse fato pode estar relacionado à pressão osmótica exercida pelas altas concentrações de glicose no meio de cultura aliada aos altos valores de C/N.

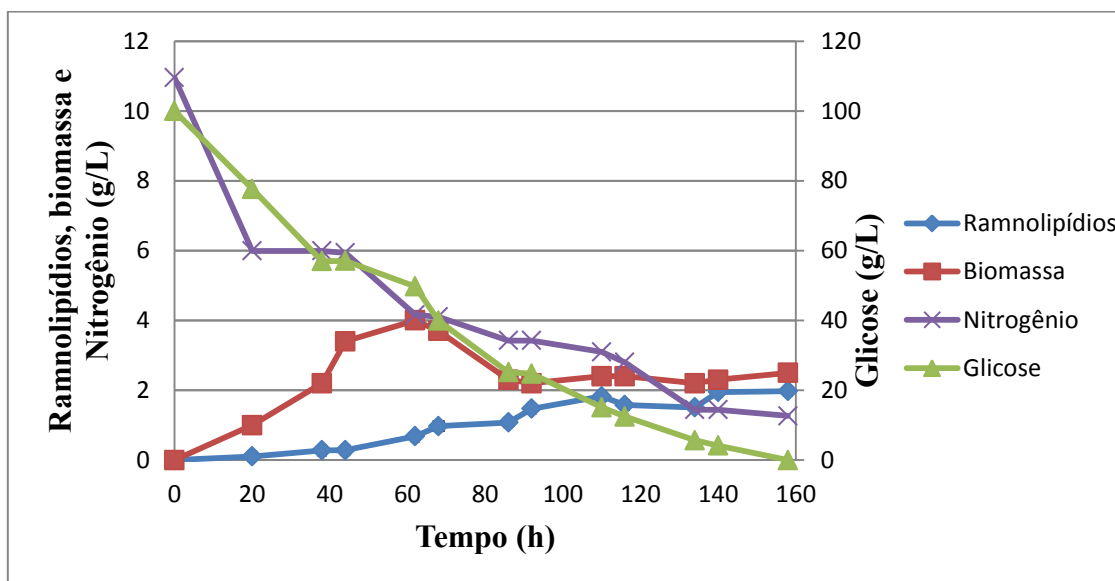
Diversos autores (GUERRA-SANTOS et al, 1984; RAZA et al, 2007; WU et al, 2007; LOVAGLIO et al, 2010) tem relatado que elevadas proporções C/N favorecem a produção de biossurfactantes. Porém Lovaglio et al, (2010), ressaltam a necessidade de uma quantidade mínima de nitrogênio presente no meio de cultura, corroborando com os resultados observados, pois o cultivo que apresentou maior produção de ramnolipídios e crescimento microbiano foi, utilizando 100g/L de glicose e uma proporção carbono nitrogênio de 160. Porém quando a C/N foi superior a esse valor houve uma queda na produção e no crescimento celular, isso ocorreu, pois a quantidade de nitrogênio presente no meio de cultura foi insuficiente para o crescimento e manutenção celular, bem como para a produção do biotensioativo.

De acordo com o observado nas figuras 3-6 e 3-7 e na discussão, a condição de cultivo escolhida para o experimento em biorreator, foi 100 g/L de glicose e 1,5 g/L de nitrato de sódio, pois foi o cultivo que apresentou melhor produção e crescimento microbiano dentre os avaliados em frascos.

3.3.3.2 Bioprocesso 4: produção de ramnolipídios utilizando 100g/L de Glicose como fonte de carbono

Na figura 3-8 pode-se visualizar o perfil de crescimento, consumo da fonte de carbono e Nitrogênio e produção de ramnolipídios em biorreator por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando 100g/L de glicose.

Figura 3-8: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando 100g/L de glicose como fonte de carbono



Fonte: Dados coletado no presente estudo.

A biomassa máxima obtida nesse cultivo foi de 4g/L em 62h, em seguida houve queda e estabilização do crescimento em torno de 2 a 2,5 g/L. A glicose foi totalmente consumida, sendo exaurida ao término do cultivo. A produção de ramnolipídios se iniciou com 20h, apresentou o ápice em 158h de cultivo, atingindo 1,97g/L.

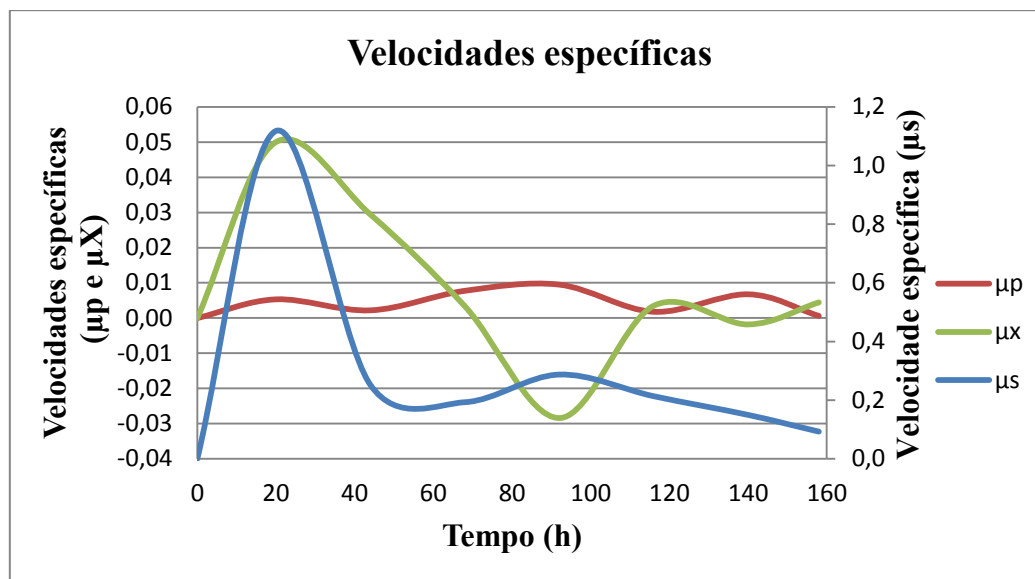
Essa produção foi inferior aos outros cultivos aqui apresentados, além disso, a glicose é uma fonte de carbono cara o que inviabiliza o processo em larga escala.

Na batelada utilizando glicose como fonte de carbono a quantidade de nitrogênio residual foi superior a dos cultivos anteriores, ao termino do processo ainda havia 1,26 g/L de Nitrogênio presente no meio de cultura.

3.3.3.3 Velocidades específicas

Calculou-se os μ_x , μ_s e μ_p , do bioprocesso, a fim de entender melhor o processo. Os resultados podem ser visualizados na figura 3-9.

Figura 3-9: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando 100g/L de glicose como fonte de carbono.



Fonte: Elaborado pelo autor do presente estudo

O μ_p máximo foi de $0,01 \text{ h}^{-1}$ em 92h, tal valor foi inferior ao atingido nos cultivos anteriores, o que reflete a baixa velocidade de formação de ramnolipídios. Assim como na fermentação utilizando BOM o principal pico de μ_s é coincidente como o pico máximo de μ_x ,

3.3.3.4 Fatores de conversão

Os valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$ podem se visualizados na tabela 5.

Tabela 3-5: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, utilizando 100g/L de glicose como fonte de carbono. Tirar bordas.

Fatores de conversão (g/g)	Tempo(h)
$Y_{x/s}$ máximo	0,117 20-44
$Y_{p/s}$ máximo	0,045 116-140
$Y_{p/x}$ máximo	2,289 44-68

Fonte: Elaborado pelo autor do presente estudo

O rendimento produto/ substrato máximo foi 0,045 g/g, atingido no intervalo de tempo de 116 140 horas foi inferior ao obtido nos cultivos com BOM e óleo de soja.

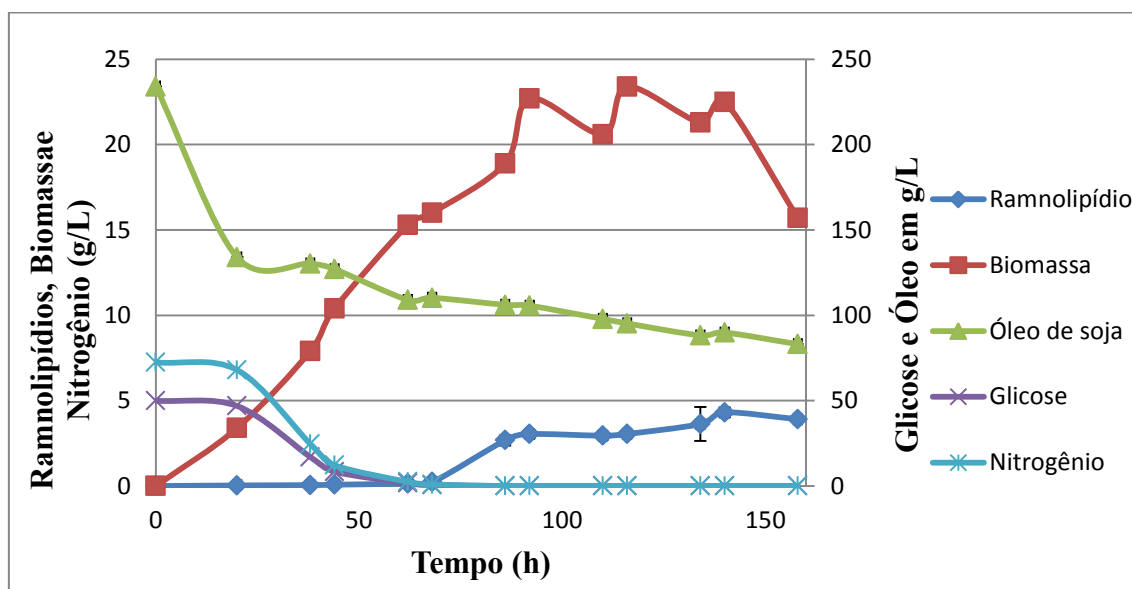
Já o $Y_{x/s}$ máximo foi de 0,117 g/g entre 20 e 44h. Com relação ao rendimento $Y_{p/x}$ o valor máximo alcançado foi de 2,289g/g este valor foi próximo ao observado na batelada utilizando óleo de soja, isso ocorreu devido a biomassa ser menor que a do cultivo com óleo, a produção também foi inferior o que acarretou em valores de $Y_{x/s}$ similares.

A produtividade ao termino do processo foi de 0,01 g/L.h, que é inferior ao encontrado nos cultivos citados anteriormente, este resultado permite concluir que a glicose, dentre as fontes avaliadas, não é adequada para a produção de ramnolipídios.

3.3.4 Bioprocesso 5: produção de ramnolipídios utilizando Glicose e óleo de soja como fonte de carbono

A figura 3-10 mostra o perfil de produção de ramnolipídios no cultivo utilizando glicose (50g/L) e óleo de soja (233,5g/L), como fontes de carbono.

Figura 3-10: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando 50g/L de glicose e 233,5g/L de óleo de soja como fonte de carbono



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O uso simultâneo de glicose e óleo de soja como fontes de carbono favoreceu o crescimento microbiano, que atingiu 23,4g/L em 116 horas de cultivo, Observa-se que

inicialmente (0-20 horas), o aumento da biomassa ocorre principalmente devido ao consumo de óleo; entre 20 e 60 horas as duas fontes são consumidas, entretanto a absorção de glicose é preferencial chegando a ser totalmente exaurida do meio em 86 horas de cultivo. No final do processo tem-se 83g/L de óleo residual.

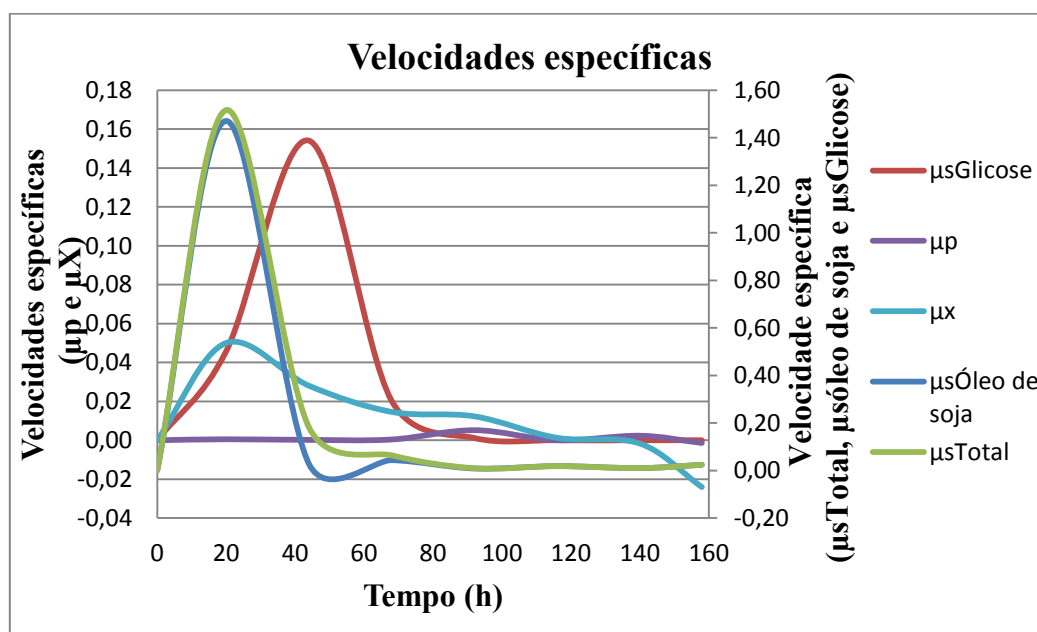
Em relação à produção de ramnolipídios, a adição de óleo junto com a glicose, acarretou em um aumento de 118% na concentração do produto, quando comparado ao ensaio onde se utilizou apenas glicose. Entretanto a produção foi inferior à obtida nos cultivos utilizando BOM e óleo de soja separadamente.

O consumo de nitrogênio apresenta um perfil parecido ao consumo de glicose, o que nos leva a acreditar que o nitrogênio é consumido concomitantemente essa fonte de carbono levando ao crescimento microbiano.

3.3.4.1 Velocidades específicas

Na figura 3-11 pode-se observar os valores das velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e formação do produto.

Figura 3-11: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando 50g/L de glicose e 233,5g/L de óleo de soja como fonte de carbono



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O μ_p máximo foi de $0,005 \text{ h}^{-1}$ no tempo de 92h, tal valor foi inferior ao atingido nos cultivos anteriores, isso se deve à baixa produção de ramnolipídios associada a uma alta biomassa, como pode ser visualizado na figura 11.

O pico máximo μ_s Óleo de soja é coincidente como o pico máximo de μ_x , o que indica que nesse intervalo a bactéria está utilizando óleo de soja para crescer, Porém o pico máximo μ_s Glicose aparece posteriormente um pouco deslocado para a direita, o que faz com que o pico μ_x apresente uma base mais alargada, o que indica o uso da glicose também para o crescimento microbiano.

3.3.4.2 Fatores de conversão

Foram calculados também os fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, para o calculo desses valores se utilizou o valor de μ_s Total (Tabela 3-6).

Tabela 3-6: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, utilizando glicose e óleo de soja como fonte de carbono, os fatores de conversão expostos foram calculados frente ao total da fonte de carbono.

Fatores de conversão (g/g)	Tempo(h)
$Y_{x/s}$	1,27 68-92
$Y_{p/s}$	0,53 68-92
$Y_{p/x}$	0,42 68-92

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

O rendimento produto/ substrato máximo foi $0,42 \text{ g/g}$, atingido em 92 horas, valor inferior aos rendimentos máximos observados com BOM e óleo de soja, que atingiram 0,55 e 3,2, respectivamente. Entretanto foi superior ao obtido na fermentação utilizando apenas glicose como fonte de carbono.

O rendimento $Y_{x/s}$ máximo foi de $1,27 \text{ g/g}$ e ocorreu em 92h, o que mais uma vez demonstra o alto crescimento celular. Com relação a proporção produto/ biomassa ($Y_{p/x}$), o valor máximo foi de $0,42 \text{ g/g}$ no tempo de 92 horas, esse rendimento foi

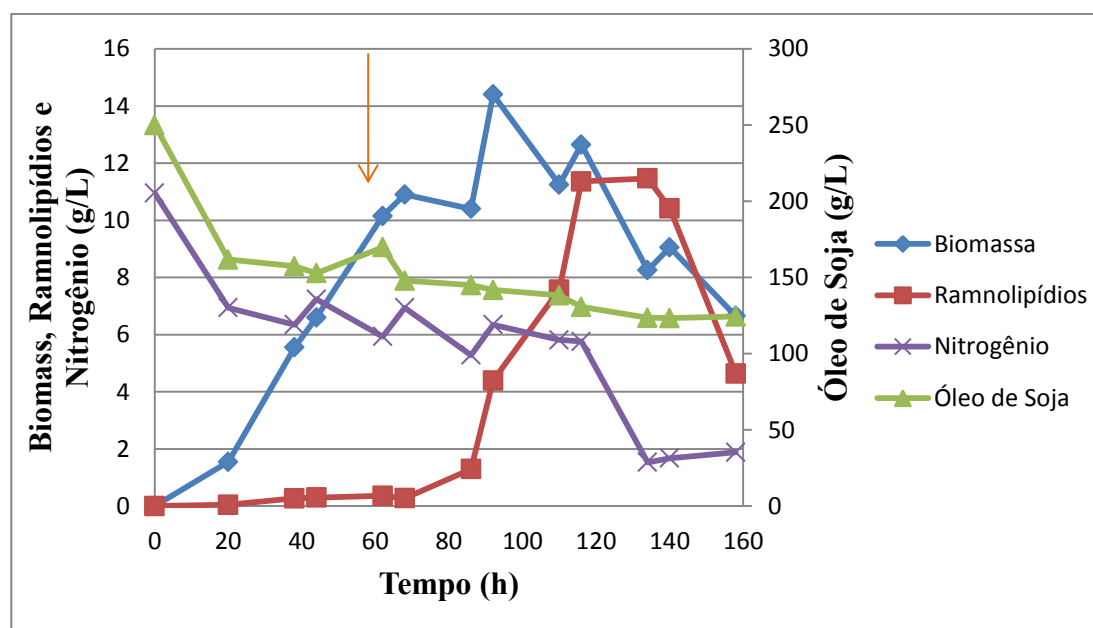
inferior ao de todos os outros cultivos. A produtividade obtida (0,027 g/L.h), só foi superior à do cultivo com 100g/L de glicose.

Frente a todos os resultados obtidos, a fonte de carbono escolhida para dar continuidade aos experimentos foi o óleo de soja, por apresentar a maior produção, um bom rendimento e a maior produtividade dentre todos os cultivos realizados.

3.3.5 Bioprocesso 6: cultivo alimentado por pulso único para a produção de ramnolipídios utilizando óleo de soja como fonte de carbono.

A figura 3-12 apresenta os dados da batelada alimentada, na qual foi realizada alimentação em um pulso único no tempo de 58h, sendo adicionado 23,85 g/L de óleo de soja.

Figura 3-12: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte de carbono a alimentada com pulso no tempo de 58h com 23,85g/L de óleo de soja (a seta marca o início da alimentação).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A alimentação em pulso único favoreceu a crescimento microbiano que atingiu 14,4 g/L em 92h de cultivo, porém a produção de biossurfactante foi prejudicada com produção máxima de 11,46 g/L de ramnolipídios em 134h.

A concentração de óleo residual foi 124,4 g/L, tal concentração foi mais de 7 vezes superior à observada no bioprocessos 1.

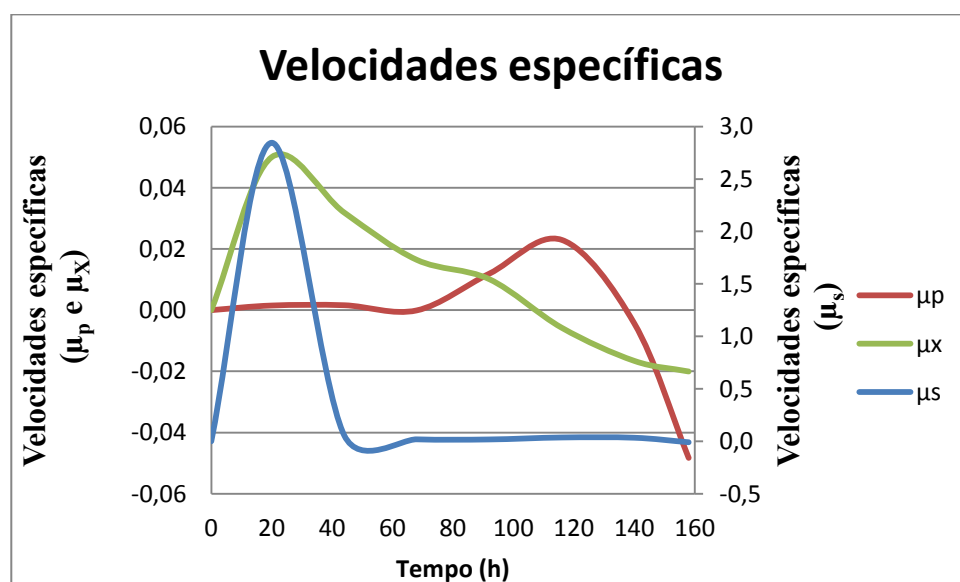
O perfil desse cultivo também foi diferente do observado na batelada utilizando 250 g/L de óleo de soja como fonte de carbono, no presente cultivo a biomassa não estabilizou, e a produção de ramnolipídios foi tardia, passando a ser expressiva apenas após 86h.

De acordo com Lang & Wullbrandt, (1999) é necessária à limitação do crescimento microbiano junto a um excesso de fonte de carbono, para a alta produção de ramnolipídios, porém essa limitação no crescimento ocorreu de maneira tardia, após as 92h, provavelmente devido ao excesso de nitrogênio no meio de cultura até esse tempo de cultivo o que retardou produção do biotensioativo. De acordo com Syldatk et al, (1985), o excesso de fonte de carbono pode provocar a inibição na produção de biossurfactantes, o que também pode ter ocorrido nesse experimento.

3.3.5.1 Velocidades específicas

A figura 14 apresenta os valores das velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e formação do produto.

Figura 3-13: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando óleo de soja como fonte de carbono, e alimentação com um pulso único.



Fonte: Dados coletados no presente trabalho.

O μ_p máximo nesse bioprocesso foi de 0,023 h em 116h de cultivo, tal valor foi inferior ao atingido nos cultivos sem alimentação, onde o μ_p máximo foi de 0,061 com 68h de cultivo, acarretando em baixa produção de ramnolipídios.

O pico máximo de consumo de substrato (μ_s) é coincidente como o pico máximo de μ_x , o que indica que nesse intervalo a bactéria está utilizando óleo de soja para crescimento e manutenção celular e não para a produção do metabólito de interesse, uma vez que não há nenhum pico concomitante de μ_s e μ_p .

3.3.5.2 Fatores de conversão

A tabela 3-7 mostra os valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$.

Tabela 3-7: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$

Fatores de conversão (g/g)		Tempo(h)
$Y_{x/s}$	0,87	20-44
$Y_{p/s}$	0,03	20-44
$Y_{p/x}$	0,05	20-44

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

O fator de conversão $Y_{x/s}$ máximo foi inferior ao obtido no bioprocessamento 1 conduzido em batelada. O mesmo se deu para o fator de conversão de biomassa em produto.

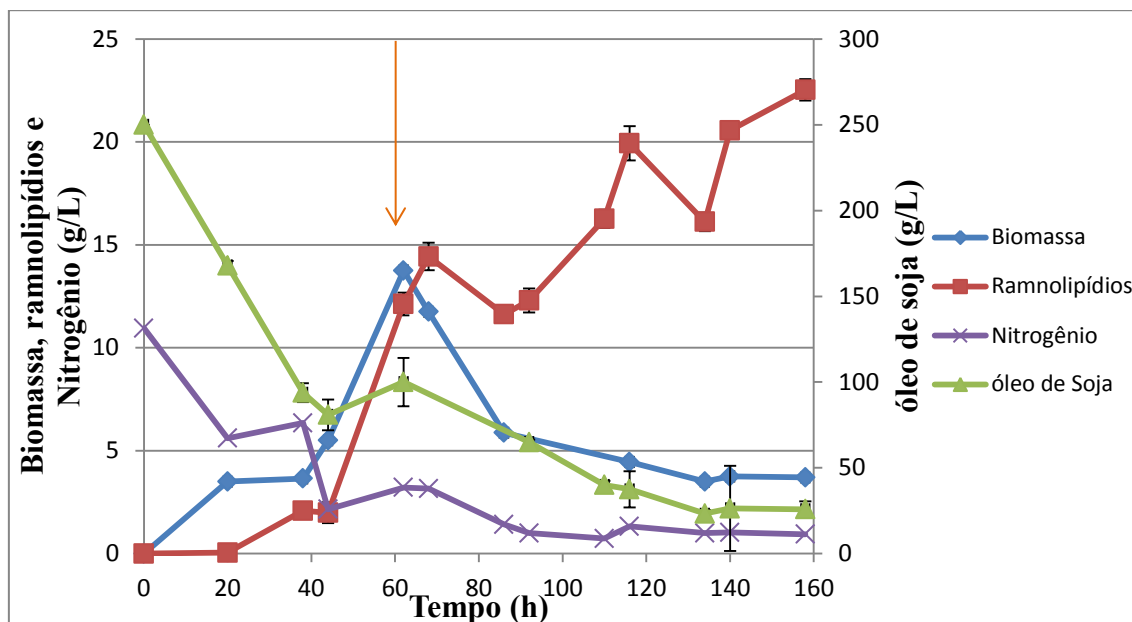
A produtividade máxima do bioprocessamento 6 foi de 0,097, sendo inferior a relatada por Lovaglio, (2011) e a observada no cultivo em batelada utilizando óleo de soja como fonte de carbono, o fato da produtividade desse cultivo ser baixa está atrelado a baixa produção quando comparada a produção obtida no cultivo em batelada.

3.3.6 Bioprocessamento 7: cultivo alimentado com vazão constante para a produção de ramnolipídios utilizando óleo de soja como fonte de carbono.

Na figura 3-14 pode-se visualizar o crescimento microbiano, a produção de ramnolipídios, os consumos de óleo de soja e de nitrogênio, do cultivo em batelada alimentada, utilizando uma vazão constante.

Figura 3-14: Produção de ramnolipídios (g/L), Biomassa (g/L) e consumo de substrato (g/L) da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando 250g/L de óleo de soja como fonte

de carbono a alimentada com fluxo contínuo (a seta laranja marca o início da alimentação).



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Como pode-se observar após a alimentação ser iniciada com 60h a biomassa passa a cair e a concentração de ramnolipídios apresenta uma leve queda após o término da alimentação com 68h. Essas quedas de biomassa e produção refletem na quantidade final de biossurfactante que foi de 22,52 g/L, valor inferior obtido com o cultivo em batelada, que foi de 36,4 g/L de ramnolipídios esta redução foi de 38%.

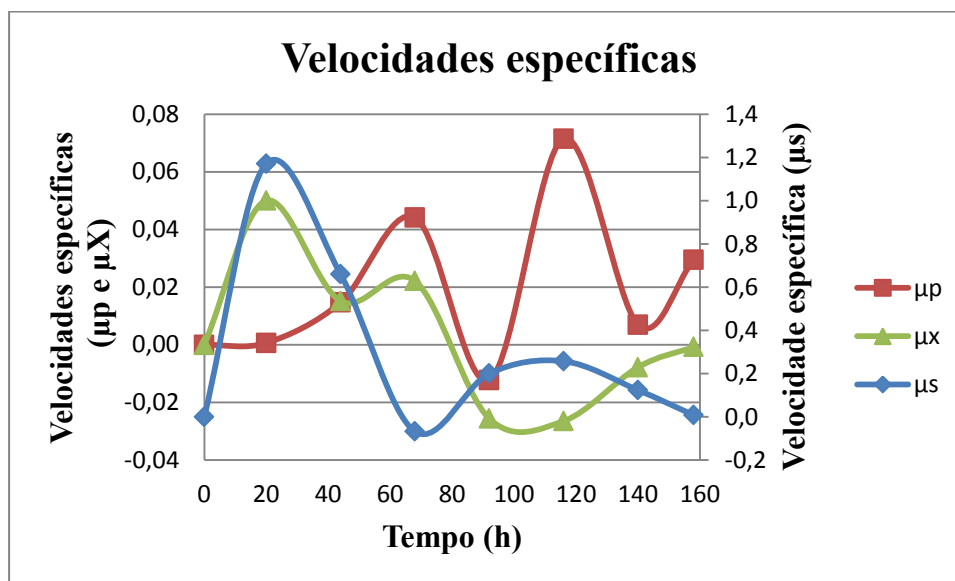
Lovaglio et al, (2010) também relataram uma queda na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* quando o método de cultivo empregado foi a batelada alimentada, tal qual ocorreu no presente trabalho.

A baixa produção nesse cultivo pode estar relacionada a queda na biomassa observada após 60 h de cultivo.

3.3.6.1 Velocidades específicas

A figura 3-15 apresenta as velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e formação do produto.

Figura 3-15: Velocidades específicas de formação de biomassa (μ_x), produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) utilizando óleo de soja como fonte de carbono, e alimentação contínua.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

O μ_p máximo foi de $0,0295 \text{ h}^{-1}$ no tempo de 158h, sendo inferior ao observado quando o cultivo foi realizado em batelada (bioprocesso 1).

O pico máximo μ_s é coincidente como o pico máximo de μ_x , porém nesse cultivo já havia uma produção inicial de biossurfactante, que indica que nesse intervalo a bactéria está utilizando óleo de soja para crescimento e para a produção do metabólito de interesse.

3.3.6.2 Fatores de conversão

A tabela 3-8 mostra os fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$.

Tabela 3-8: Valores máximos dos fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$

Fatores de conversão (g/g)	Tempo(h)	
$Y_{x/s}$	0,04	0-20
$Y_{p/s}$	3,70	140-158
$Y_{p/x}$	1,99	44-68

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

O fator de conversão $Y_{x/s}$ máximo foi de 0,04g/g sendo inferior ao obtido no bioprocesso 1 (2,8 g/g), isso ocorreu devido a queda na biomassa verificada na figura 15.

O fator de conversão $Y_{p/x}$, também foi inferior ao observado no cultivo em batelada que atingiu 2,4g/g.

A produtividade do bioprocesso 7 foi de 0,14, também inferior a relatada por Lovaglio, (2011) e a observada no cultivo em batelada. Porém essa produtividade foi a segunda maior encontrada dentre os experimentos realizados.

Apesar de alguns trabalhos relatarem o acréscimo na produção de ramnolipídios quando o cultivo em batelada alimentada é implementado (TRUMMLER et al, 2003; ZHU et al, 2012), no presente trabalho o sistema de alimentação empregado não favoreceu a produção do metabólito de interesse, o que está de acordo com o encontrado por Lovaglio et al, (2010) que relata uma queda de 4 vezes na produção quando o cultivo é conduzido em batelada alimentada.

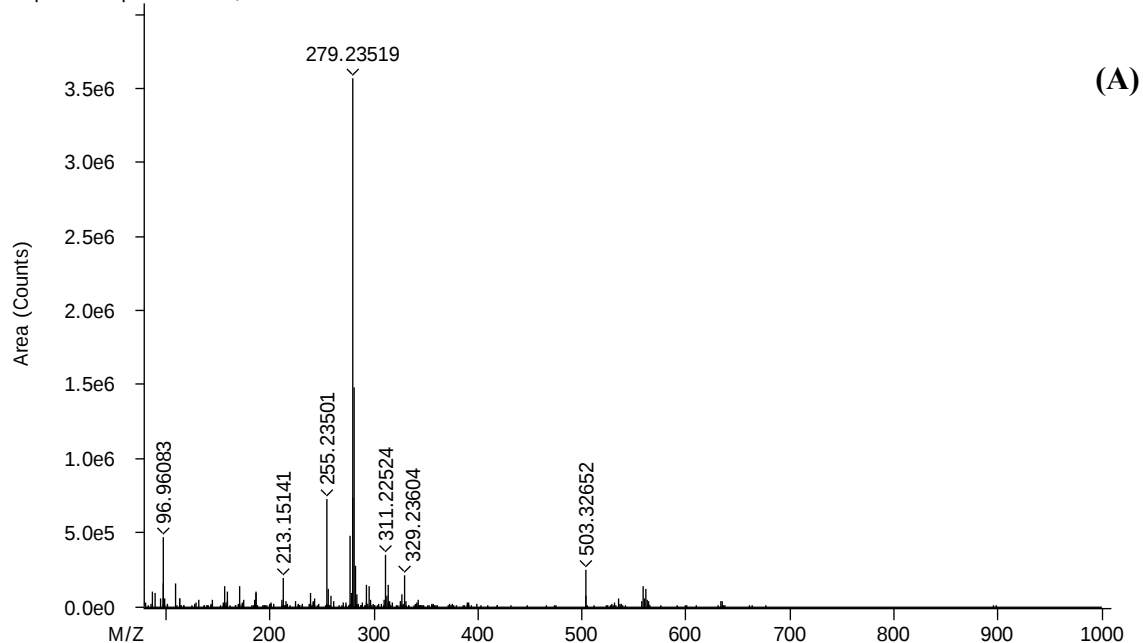
A produção de biossurfactantes por *Candida antarctica*, utilizando o cultivo em batelada também reduziu a concentração final do metabólito de interesse a redução na produção nesse caso foi 38,5% (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000). Esta queda pode estar ligada ao excesso da fonte de carbono no meio de cultura (SYLDATK et al, 1985).

3.3.7 Homólogos de Ramnolipídios produzidos no cultivo utilizando óleo de soja e glicose como fonte de carbono.

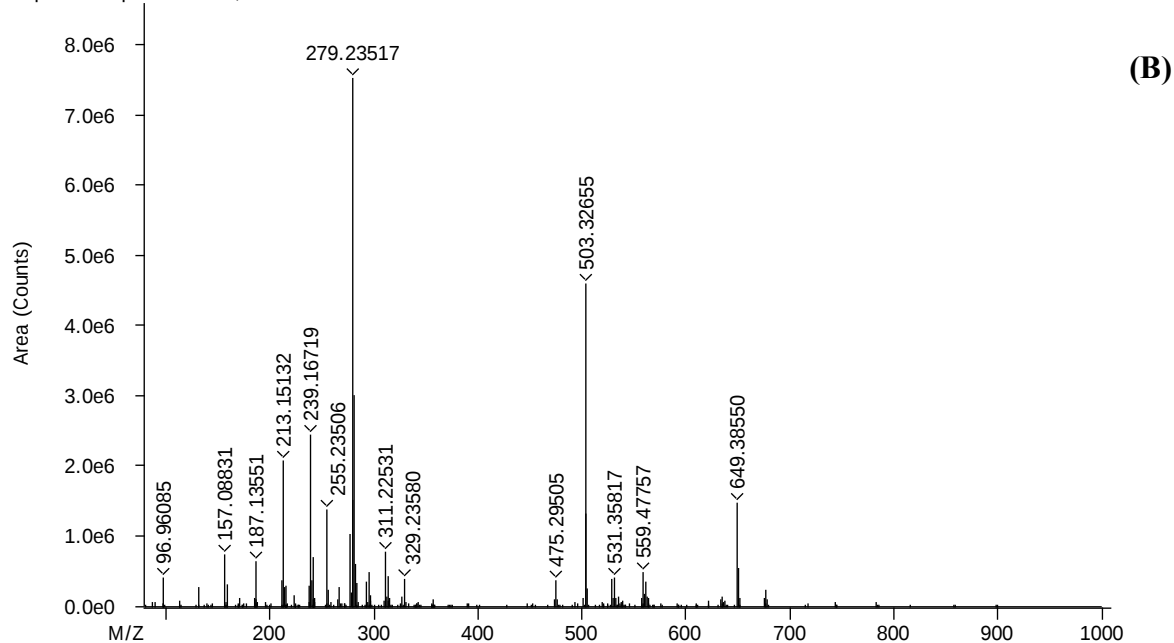
As análises por ESI(-) - MS forneceram a composição dos homólogos produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1. A Figura 3-16 mostra os íons obtidos das amostras de ramnolipídios produzidos no cultivo utilizando glicose (50g/L) e óleo de soja (233,5g/L), como fontes de carbono, nos tempos 38, 86 e 158 horas de cultivo.

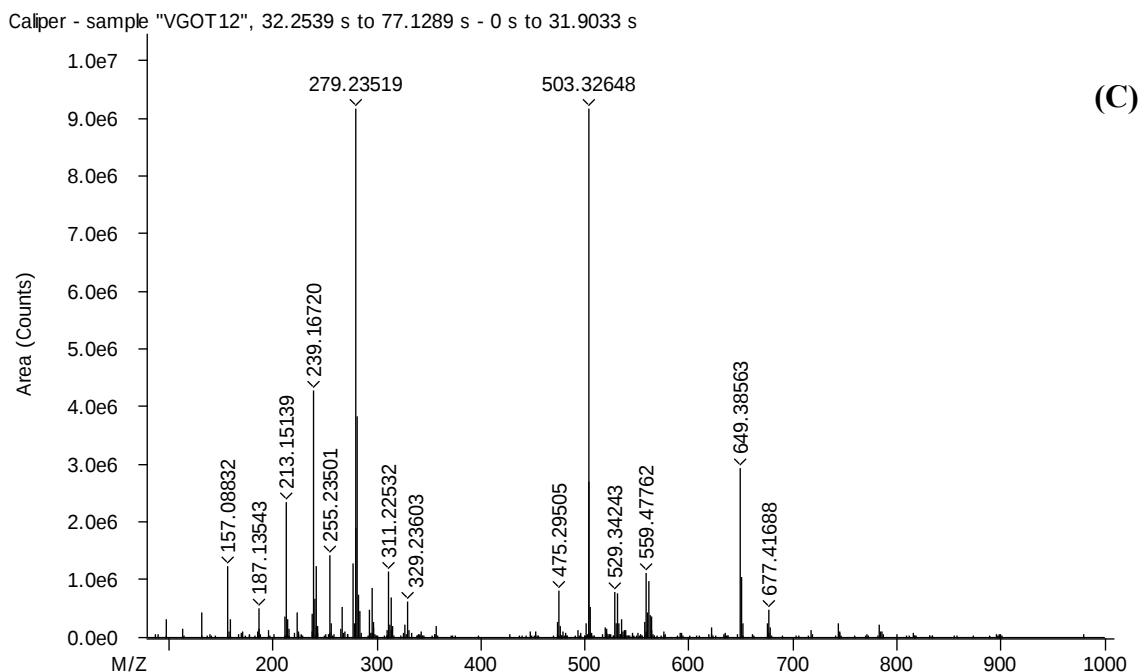
Figura 3-16: ESI (-) – MS de amostras de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando a mistura glicose e óleo de soja como fonte de carbono (A) 38, (B) 86, (C) e 158 horas de cultivo.

Caliper - sample "VGOT3", 32.6045 s to 70.4678 s - 0 s to 32.2539 s



Caliper - sample "VGOT7", 31.9033 s to 71.8701 s - 0 s to 31.2021 s





Fonte: elaborado pelo autor.

Os íons m/z 279 corresponde ao ácido linoléico (CATHARINO et al, 2007), que é um ácido graxo proveniente do óleo de soja empregado como fonte de carbono.

De acordo com Déziel et al, 2003 os ácidos graxos são intermediários da formação dos ramnolipídios, além disso eles possuem atividade surfactante, sendo capazes de reduzir a tensão superficial da água para valores inferiores ao alcançado pelos ramnolipídios.

A tabela 3-9 apresenta a composição e a abundância relativa dos ácidos graxos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 ao longo do cultivo.

Tabela 3-9: Composição química e abundância relativa de ácidos graxos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 ao longo do cultivo utilizando a mistura glicose + óleo de soja como fonte de carbono.

Composição Elementar Estrutura/ Insaturações	Nomenclatura / [M-H] Fragmentações m/z	Abundância Relativa (%)		
		38h	86h	158h
$C_{12}H_{22}O_3$ / $C_{12:1}$	β -hidroxidodecenoil [213] 55,59 e 113	5,40	28,40	25,67
$C_{14}H_{24}O_3$ / $C_{14:2}$	β -hidroxi tetra-di-decenoil [239] 59	6,75	33,78	47,3
$C_{10}C_8$ / C_8C_{10}	β -hidroxi-octanoil- β -hidroxidecanoato [329] 59, 159, 187, 283, 311	0	5,40	6,75

Fonte: elaborado pelo autor.

Pode-se visualizar na tabela 3-9 que a composição e a abundância relativa dos ácidos graxos produzidos pelo micro-organismo variam ao longo do cultivo, com 38 horas o ácido graxo β -hidroxi-octanoil- β -hidroxidecanoato não foi identificado no cultivo, porém passa a ser após 86 horas. A abundância relativa dos 3 ácidos graxos produzido pela bactéria aumenta ao longo do processo chegando ao máximo ao termino do cultivo.

A tabela 3-10 mostra Composição química e abundância relativa dos homologos de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1.

Tabela 3-10: Composição química e abundância relativa dos homologos de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 ao longo do cultivo utilizando a mistura glicose + óleo de soja como fonte de carbono.

Composição		[M-H]-	Abundância Relativa (%)		
Elementar	Estrutura/ Insaturações	m/z	38h	86h	158h
C ₂₄ H ₄₄ O ₉	RhaC8C10 / RhaC10C8	475	0	5,40	9,46
C ₂₆ H ₄₈ O ₉	RhaC10C10	503	6,75	62,16	100
	RhaC10C12:1 /				
C ₂₈ H ₅₀ O ₉	RhaC12:1C10	529	0	0	9,46
C ₂₈ H ₅₂ O ₉	RhaC10C12 / RhaC12C10	531	0	5,4	0
C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	RhaRhaC10C10	649	0	20,27	32,43
	RhaRhaC10C12 /				
C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	RhaRhaC12C10	677	0	0	5,4

Fonte: elaborado pelo autor.

Pode-se observar na tabela 3-10 que os homólogos detectados ao longo do cultivo variam, com 38 h de cultivo, apenas o homólogo RhaC10C10 foi identificado, porém ao longo do processo outros homólogos de ramnolipídios foram detectados.

Lovaglio, (2011) relata em seu trabalho que a linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, produz 8 diferentes homólogos de ramnolipídios utilizando óleo de girassol ou borra de óleo de milho como fonte de carbono, no presente estudo foram encontradas apenas 6 diferentes homólogos de ramnolipídios. Os homólogos não encontrados foram o RhaRhaC8C10 / RhaRhaC10C8 cuja a razão massa carga é 621 e o homologo de razão massa carga 675 RhaRhaC10C12:1 /RhaRhaC12:1C10.

A variação na composição está associada principalmente à linhagem, composição do meio de cultura, condições de cultivo e idade da cultura (MATA-SANDOVAL et al, 1999). Dentre os fatores que afetam a composição dos homólogos a principal diferença entre o presente estudo e o trabalho realizado por Lovaglio, (2011) foi a fonte de carbono utilizada. Portanto o uso de glicose e óleo de soja como fonte de carbono afetou a composição dos homólogos de ramnolipídios produzidos.

4 CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DOS RAMNOLIPÍDIOS NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES



4.1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas que possuem regiões com polaridades distintas. Esses compostos são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial (MULLIGAN, 2005). Eles possuem varias propriedades funcionais conhecidas e exploradas em diversos setores comerciais, os surfactantes também são requeridos dentro da área agrícola (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). Segundo Sachdev e Cameotra, (2013) em 2004, 0,2 milhões de toneladas de surfactantes eram empregados na proteção da lavoura e na formulação de agrotóxicos.

Os biossurfactantes são compostos naturais que possuem características similares aos surfactantes sintéticos. Os produtores de biossurfactantes mais bem estudados são micro-organismos, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BANAT et al, 2000; DESAI; BANAT, 1997).

Os biossurfactantes possuem diversas vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos, eles podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, possuem baixa ou nenhuma toxicidade, alta especificidade, são efetivos em condições extremas, tais como de alta salinidade e ampla faixa de pH possuem grande diversidade estrutural e alta biodegradabilidade (BENINCASA et al, 2008; LOVAGLIO et al, 2011; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

Esses metabólitos microbianos podem ser aplicados na agroindústria, sendo seu principal atrativo para o setor a atividade antimicrobiana, há relatos dessas biomoléculas atuando frente a micro-organismos fito-patógenos (VARNIER et al, 2009; VATSA et al, 2010). Além de aturem como antimicrobianos estudos apontam que os ramnolipídios podem ativar o sistema imunológico de *Arabidopsis thaliana*, o que ajudaria no combate a pragas (SANCHEZ et al, 2012).

Devido ao estímulo dos últimos anos para o uso de produtos de baixo impacto ambiental, denominados de produtos verdes, é provável que haja um crescimento na utilização dos surfactantes biológicos, tanto na substituição dos surfactantes sintéticos como para novas aplicações na agroindústria, frente a isso se faz necessário avaliar a influência desses metabólitos na germinação de sementes de plantas cultiváveis, o que pode ainda levar a uma nova aplicação desses bioprodutos.

Portanto no presente estudo foi avaliada a influência dos ramnolipídios produzidos anteriormente utilizando como fonte de carbono óleo de girassol. O micro-organismo empregado na produção foi *P. aeruginosa* LBI 2A1

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo empregado nos experimentos realizados foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, o qual é proveniente de um banco de mutantes randômicos do Laboratório de Microbiologia Industrial – Depto de Bioquímica e Microbiologia – Unesp Rio Claro. Esse micro-organismo encontra-se acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% v/v, em freezer a -20°C.

4.2.2 Meio de cultura

4.2.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato

O meio de cultura utilizado possui a seguinte constituição em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,1; NaNO_3 - 1,5; 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; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 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.

Esse meio de cultura foi utilizado para o crescimento microbiano que serviu como inóculo para o biorreator, a fonte de carbono utilizadas para o crescimento microbiano foi de 125g/L de óleo de girassol (LOVAGLIO, 2011).

4.2.2.2 Meio Mineral livre de cálcio

Para a produção de ramnolipídios em biorreator utilizou-se o seguinte meio (g/L): K_2HPO_4 - 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 1,0; NaNO_3 - 15. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizada foram os mesmos descritos no item anterior. A fonte de carbono empregada nessa etapa de trabalho foi 250g/L de óleo de girassol.

4.2.3 Purificação do ramnolipídios produzido

Um volume do caldo livre de células foi misturado ao mesmo volume de n-hexano (1:1), agitou-se vigorosamente até completa homogeneização. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso, até que houvesse a separação das fases. Descartou-se a fase contendo n-hexano/ óleo e adicionou-se H_3PO_4 85% 1:100 (v/v) à fase aquosa, levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do tensoativo utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, 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.

4.2.4 Espécies avaliadas

A influência dos ramnolipídios produzidos pela bactéria *P. aeruginosa* LBI 2A1 na germinação de sementes foi realizada frente às seguintes espécies: alface (*Lactuca sativa*), girassol (*Helianthus annuus*), milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*).

4.2.5 Assepsia externa das sementes

Inicialmente as sementes passaram por uma assepsia, a fim de eliminar micro-organismos de seu exterior, as sementes foram colocadas em álcool 70ºgl por um minuto, posteriormente permaneceram em solução de hipoclorito 2% v/v por mais um minuto, sendo lavadas posteriormente por um minuto em água destilada estéril.

4.2.6 Teste de germinação das sementes

Após a assepsia externa as sementes foram colocadas em placas de vidro estéreis forradas com dois papéis filtro, cada placa recebeu 30 sementes, adicionou-se ainda 7,5ml da solução a ser avaliada, nos experimentos em que utilizou-se sementes de soja essas sementes foram cobertas com dois papéis de filtro para aumentar a superfície de contato as semente com a solução. Os experimentos foram realizados sob luminosidade constante a 25 °C. A contagem de sementes germinada foi realizada em intervalos de 24 horas, foram feitas quatro repetições para cada tratamento. As soluções avaliadas foram o controle (água destilada), 0,025 0,05, 0,075% e 0,1% p/v de ramnolipídios, o pH de todas as soluções foi ajustado para 6,5.

4.2.7 Quantificação do crescimento das raízes e medida de massa seca

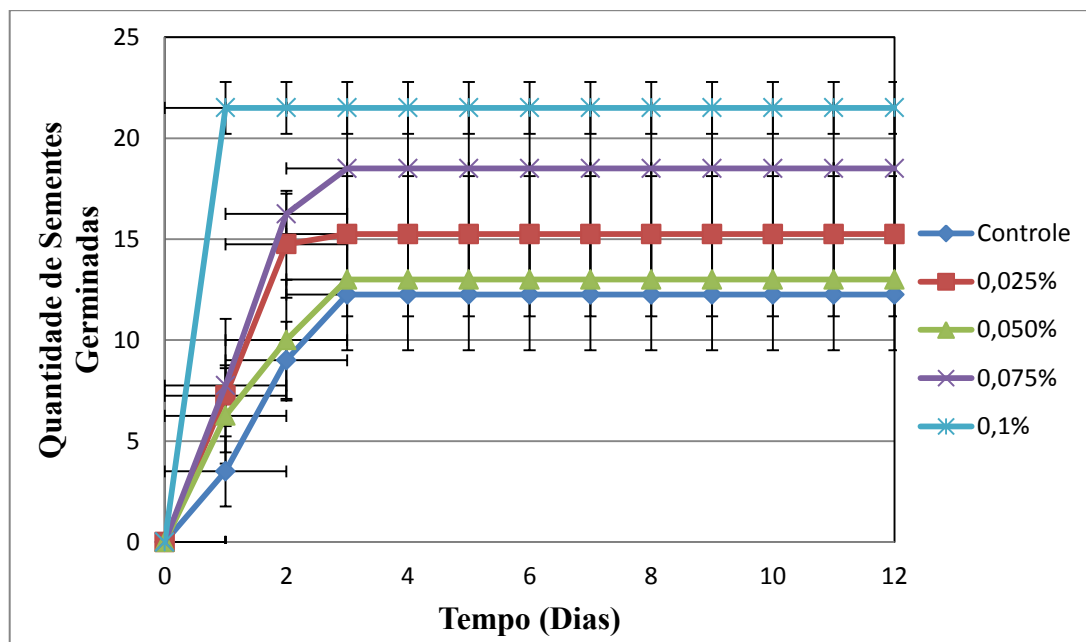
Ao término dos experimentos, as raízes de cada semente germinada foram medidas, após a medição as sementes foram colocadas em envelopes de papel identificado com o tipo de tratamento e a quantidade de sementes, para a secagem, esse procedimento foi realizado em estufa a 100°C, até que o peso seco das sementes fosse estável.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Germinação de sementes de alface

A Fig.4-1 apresenta a germinação acumulada das sementes de *Lactucca sativa* ao longo do tempo nos diferentes tratamentos.

Figura 4-1: Germinação acumulada de sementes de *L. sativa* na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios.



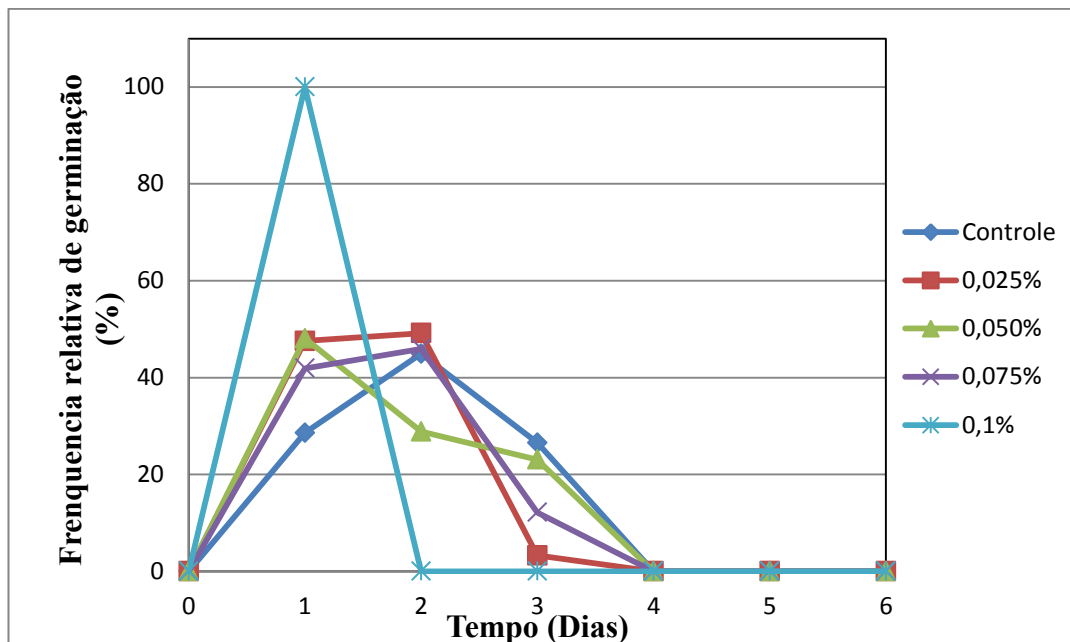
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O tratamento que apresentou a maior média de sementes germinadas foi aquele no qual se utilizou 0,1% p/v de ramnolipídios, neste ensaio a média de sementes germinadas foi 21,5. A segunda maior taxa de germinação acumulada foi observada com 0,075% p/v de ramnolipídios, com 18,5 sementes germinadas ao término dos experimentos. Todos os grupos experimentais em que os ramnolipídios foram aplicados apresentaram germinação superior ao controle, porém nos experimentos com 0,05% p/v de ramnolipídios as taxas de germinação se mostraram similares à do controle.

Há relatos de que o emprego de surfactantes favorece a germinação de sementes (DUNAEVA et al, 1992). O que está de acordo com o visualizado no presente estudo.

Na Fig. 4-2 são apresentadas as frequências relativas de germinação nos diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Figura 4-2: Frequência relativa de sementes de alface germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.



Fonte: elaborado pelo autor.

Quando as sementes de *L. sativa* são submetidas a uma solução de 0,1% p/v de ramnolipídios a frequência relativa de 100% é atingida no primeiro dia de observação, ou seja, nesse grupo experimental, todas as semente que germinaram o fizeram com 24h de experimento, demonstrando uma grande sincronia de germinação.

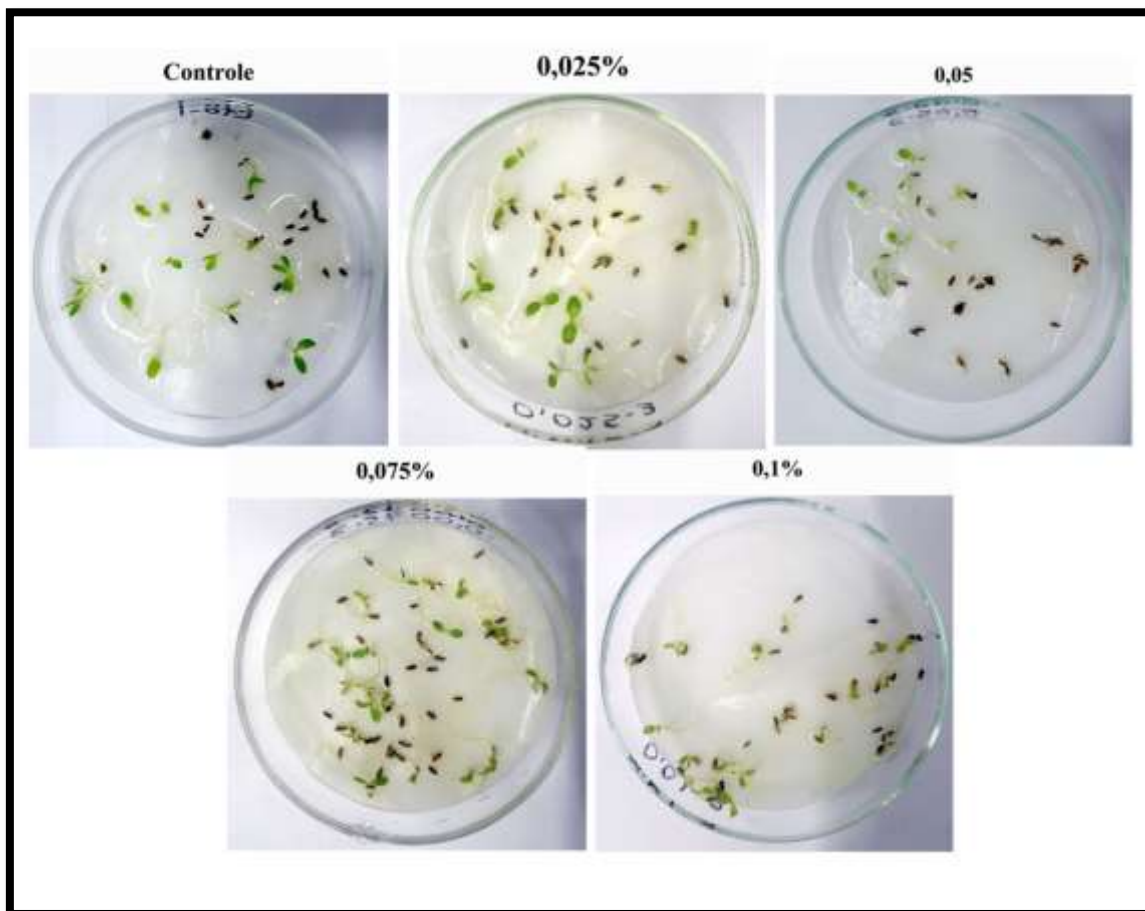
O tratamento 0,05% p/v, apresentou uma taxa de germinação próxima ao controle, porém a frequência relativa de germinação desse tratamento foi superior que a do controle com 1 dia de experimento, assim como os outros tratamentos que utilizaram o biossurfactante.

A menor velocidade de germinação observada foi a do grupo controle com o coeficiente de correlação de 0,5 e o maior coeficiente foi observado quando as sementes receberam a solução contendo 0,1% p/v de ramnolipídios com velocidade = 1, isso demonstra que o emprego desse surfactante biológico aumenta a velocidade de germinação de sementes de alface, para a lavoura esse aumento pode ser benéfico.

Segundo Heydecker e Coolbear, (1977), a sincronia na germinação das sementes é importante para a lavoura, portanto o emprego desses biotensoativo favoreceria o cultivo de alface.

A Fig. 4-3 apresenta as plântulas de alface nos diversos tratamentos após o termino dos experimentos.

Figura 4-3: plântulas de *L. sativa* nos diferentes tratamentos após o termino do experimento.

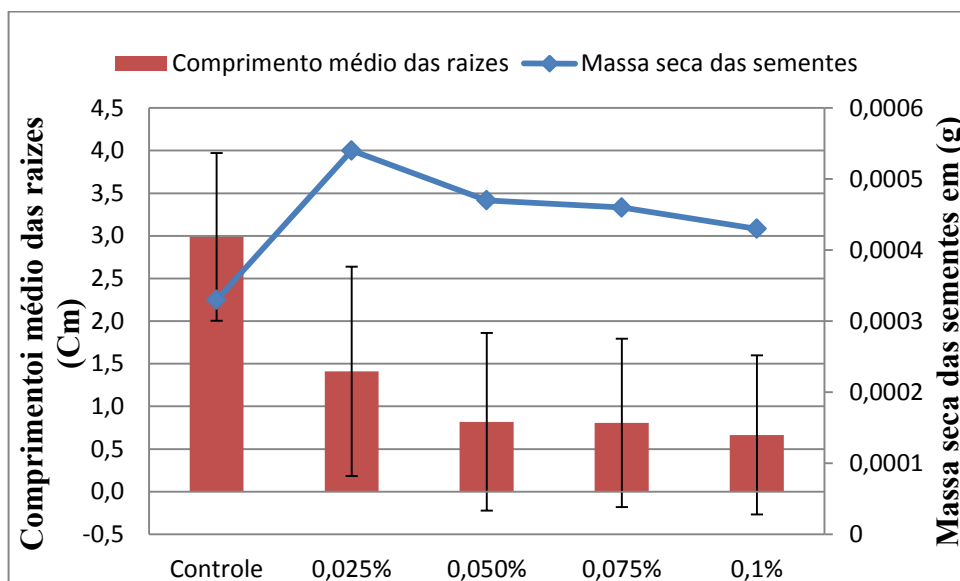


Fonte: elaborado pelo autor

É importante verificar se plântulas foram prejudicadas pela aplicação do biossurfactantes, além do teste visual, as raízes e a massa seca das plântulas foram medidas.

A figura 4-4 apresenta o comprimento médio das raízes das plântulas e a massa seca média das plântulas germinadas.

Figura 4-4: Comprimento médio das raízes das plântulas germinadas e massa seca média das sementes germinadas, nos grupos experimentais: controle, 0,025 , 0,05, 0,075 e 1% p/V de ramnolipídios



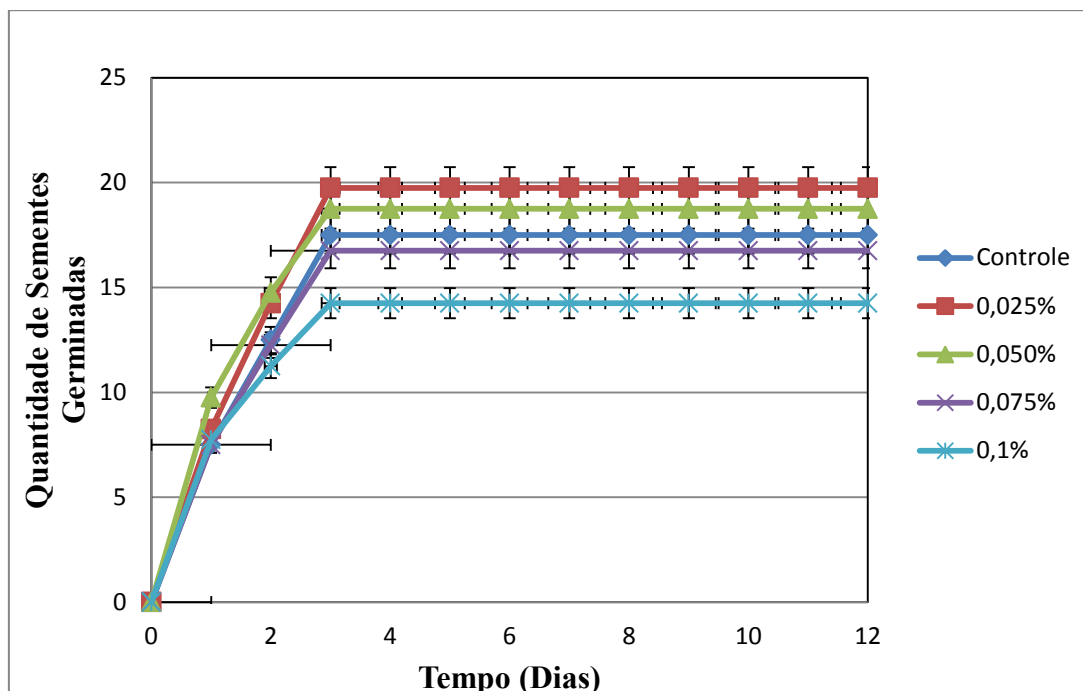
Fonte: Elaborado pelo autor.

As figuras 4-3 e 4-4 quando analisadas em conjunto permitem inferir que apesar das germinações das sementes de alface ter sido favorecida pela aplicação de ramnolipídios, as plântulas submetidas a esse biossurfactante tiveram seu desenvolvimento ligeiramente prejudicado ao longo do experimento, o comprimento médio da raiz dessas plântulas são reduzidos conforme há um aumento na concentração de ramnolipídios, sugerindo um efeito tóxico desse bioproduto frente as plântulas de *L. sativa*. Porém o acumulo de biomassa dessas sementes foi ligeiramente favorecido, isso se deve ao fato de que nos tratamentos utilizando ramnolipídios havia casos em que a parte foliar das plântulas emergia das semente antes da parte radicular.

4.3.2 Germinação de sementes de Milho

Na Fig.4-5 estão apresentados os dados da germinação acumulada das sementes de milho.

Figura 4-5: Germinação acumulada de sementes de *Zea mays* na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios



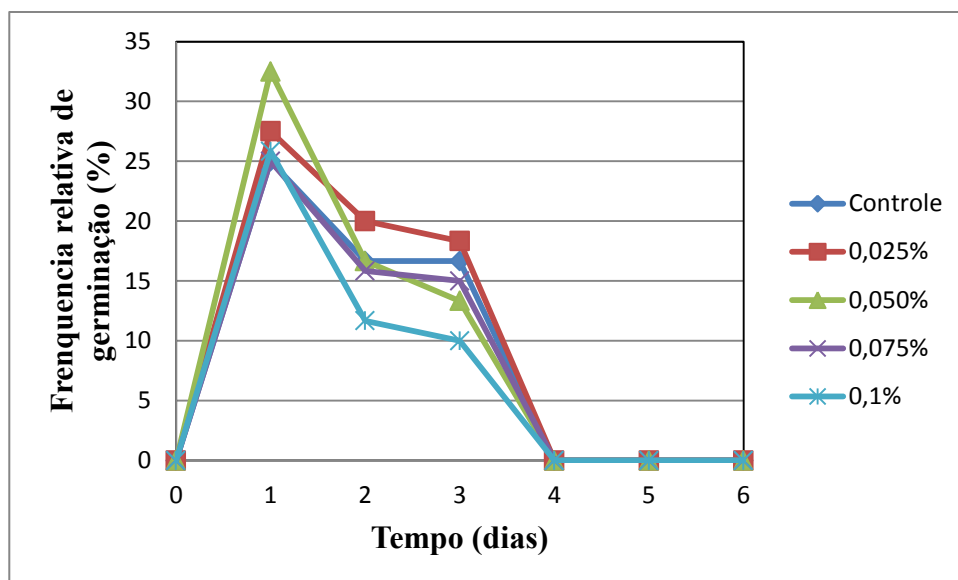
Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode-se observar na Fig.4-5 que nas concentrações de 0,025 e 0,050% p/v a aplicação de ramnolipídios favorece a germinação das sementes de milho, chegando a uma média de 19,75 sementes germinadas quando a concentração empregada é 0,025% p/v. Quando a concentração desse biossurfactante aumenta para 0,075% p/v média de sementes germinadas é estatisticamente igual a do controle ($p=0,70$), porém na concentração de 0,1% p/v a germinação acumulada passa a ser inferior ao controle.

Hurt e Hodgson, (1987) relataram que o uso dos surfactantes tween 20 e tween 80 em concentrações que variaram de 0,05 até 0,4% v/v favoreceram a germinação de *Echinochloa crus-galli*. Spurrier e Jackobs, (1955), observaram que *Triticum aestivum* L. tem sua germinação afetada quando em contato com tween 80 na concentração de 1%, ou seja, a presença dos surfactantes favorece a germinação de sementes até certa faixa, passando a ser prejudicial á partir de uma dada concentração. O mesmo foi observado em nossos experimentos utilizando semente de milho, nas concentrações de até 0,05% p/v de ramnolipídios a germinação é favorecida, porém na concentração 0,1% p/v, a germinação passa a ser prejudicada.

A Fig. 4-6 ilustra a frequência relativa das sementes de milho ao longo do tempo.

Figura 4-6: frequência relativa de sementes de milho germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.

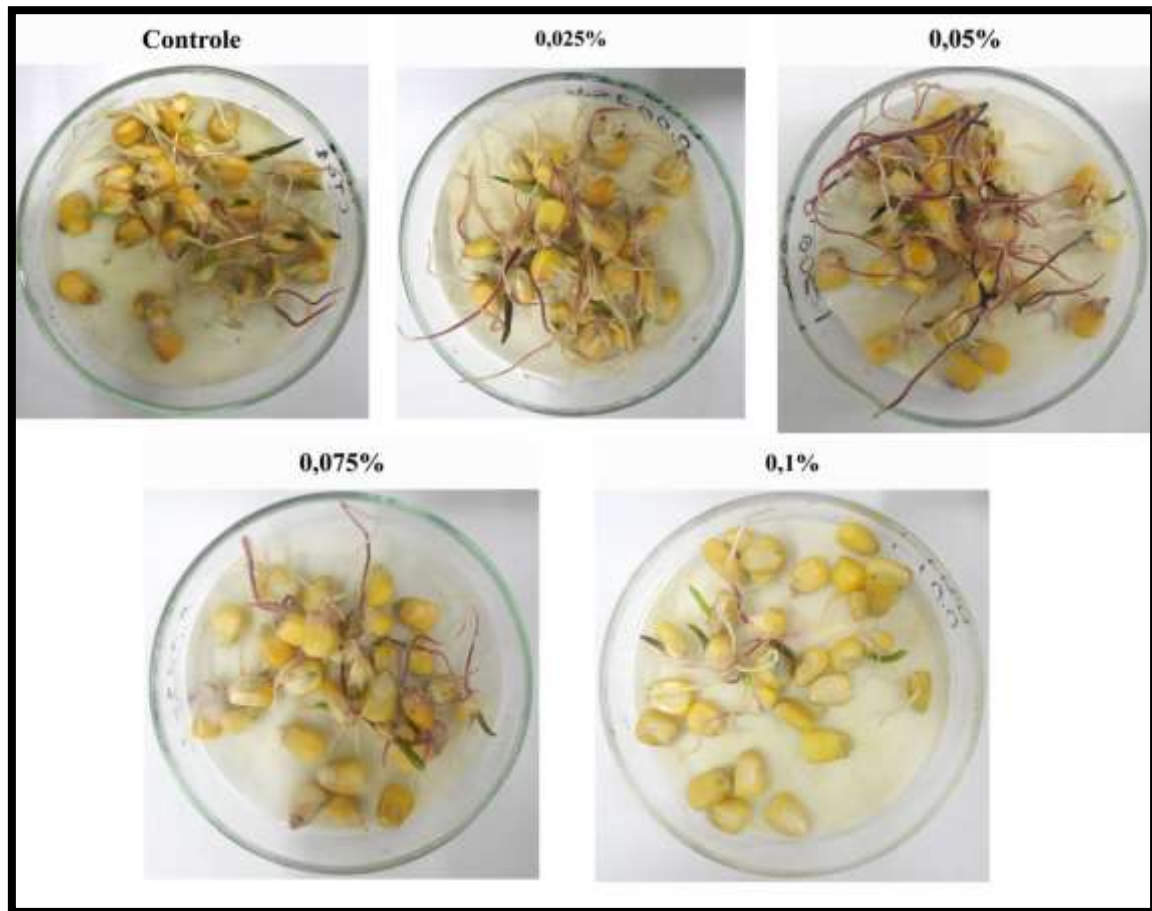


Fonte: Elaborado pelo autor.

A frequência relativa de germinação das sementes de milho ao longo do tempo apresenta um perfil bastante parecido em todos os tratamentos, portanto para essa espécie os ramnolipídios não exerceram influência significativa na distribuição da germinação das sementes.

Na Fig.4-7 pode-se visualizar as placas contendo as plântulas de milho.

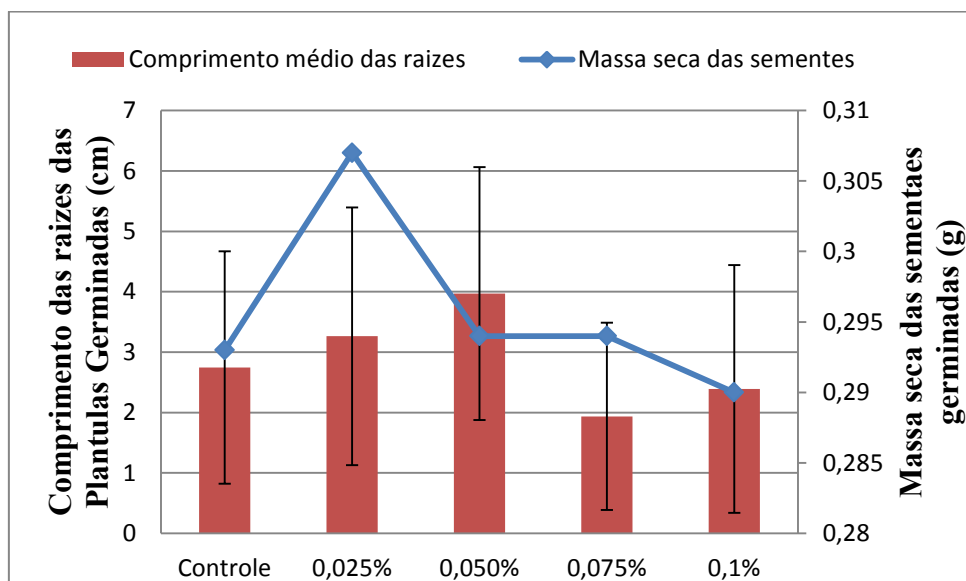
Figura 4-7: plântulas de *Zea mays* nos diferentes tratamentos após o termino do experimento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura abaixo (Fig.4-8) são apresentados os comprimentos médios das raízes e a massa seca das plântulas de *Zea mays*.

Figura 4-8: comprimento médio e massa seca das raízes das plântulas de milho germinadas, nos grupos experimentais: controle, 0,025, 0,05, 0,075 e 1% p/v de ramnolipídios.



Fonte: Elaborado pelo autor.

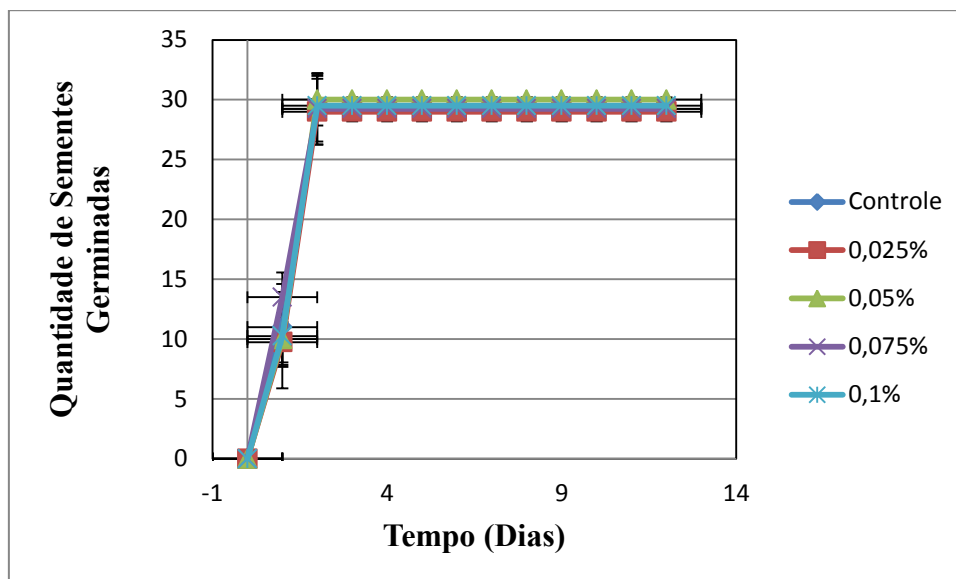
Avaliando as figuras 4-7 e 4-8 nota-se que a aplicação de ramnolipídios favoreceu o crescimento da região radicular das plântulas de milho nas concentrações 0,025 e 0,050% p/v, porém as concentrações superiores a 0,05% p/v apresentam um crescimento radicular inferior ao controle, ou seja, o crescimento radicular é afetado negativamente por concentrações superiores a 0,05% p/v de ramnolipídios.

A Fig.4-8 nos mostra ainda que apesar do comprimento das raízes de milho ser prejudicado nas concentrações 0,075 e 0,1% p/v a massa seca desses tratamentos continua próxima a do grupo controle, esse fato ocorre, pois, as raízes das plântulas nessas concentrações apresentaram mais ramificações.

4.3.3 Germinação de sementes de Soja

A germinação acumulada das sementes de soja pode se observada na Fig. 4-9.

Figura 4-9: Germinação acumulada de sementes de *Glycine max* na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios.

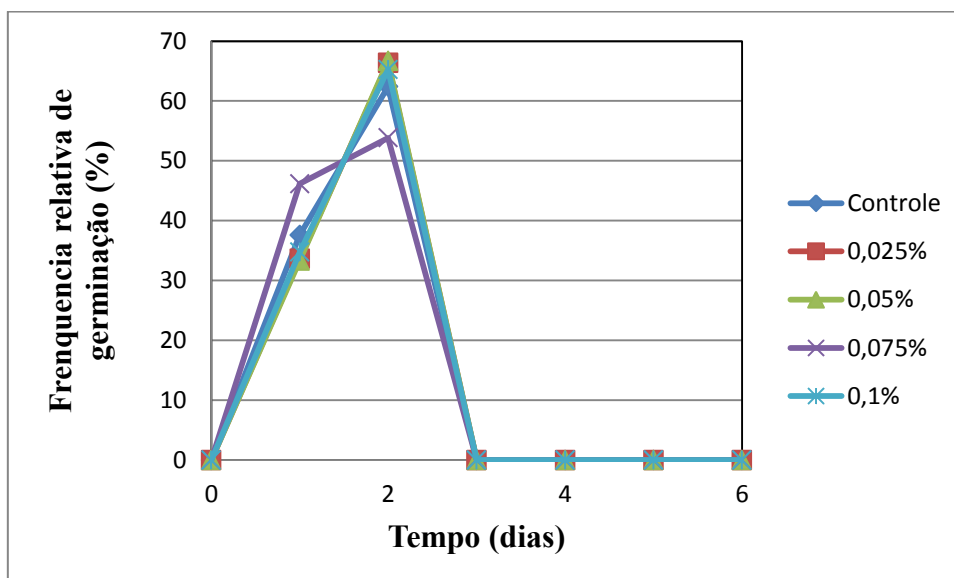


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nos experimentos utilizando as sementes de soja, o comportamento da germinação foi diferente do observado para alface e milho, no caso da soja não houve influência dos ramnolipídios na taxa de germinação das sementes ($p=0,3$), portanto se esse biossurfactante for empregado para a biorremediação de uma área, é possível a plantação de soja nesse local, pois as sementes dessa espécie não são afetadas negativamente pelos ramnolipídios. Além disso a aplicação desse biossurfactante como substituto dos surfactantes sintéticos, nas diversas aplicações que essas moléculas possuem dentro da agroindústria, não acarretaria danos a germinação das sementes de *Glycine max*.

A Fig.4-10 apresenta os dados da frequência relativa de germinação das sementes de soja.

Figura 4-10: frequência relativa de sementes de soja germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.

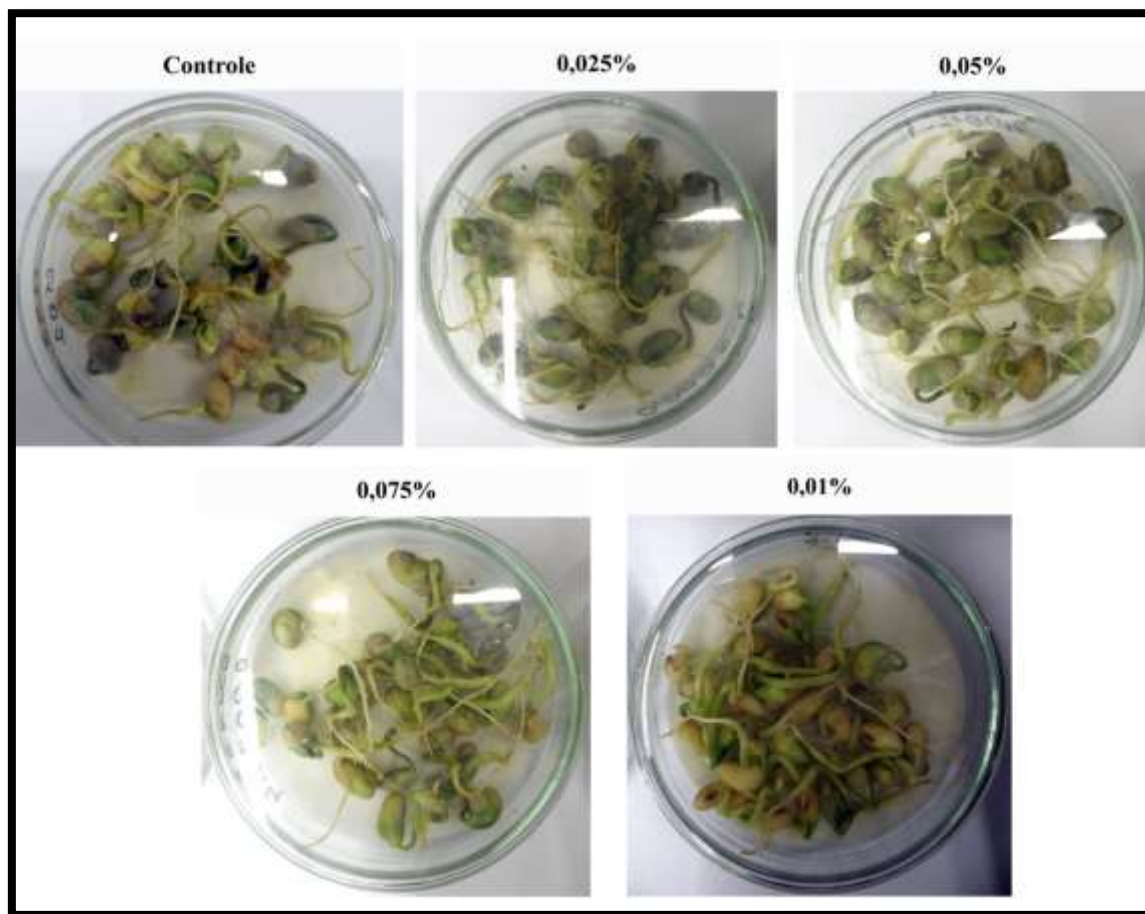


Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Como apresentado na figura acima o perfil da frequência relativa de germinação ao longo do tempo é similar em todos os tratamentos, exceto no que foi empregada a concentração de 0,075% p/v de biossurfactante.

A Fig.4-11 mostra as plântulas de soja germinadas ao longo do experimento, um exame visual não é capaz de identificar alteração nas plântulas devido à aplicação de ramnolipídios nas sementes.

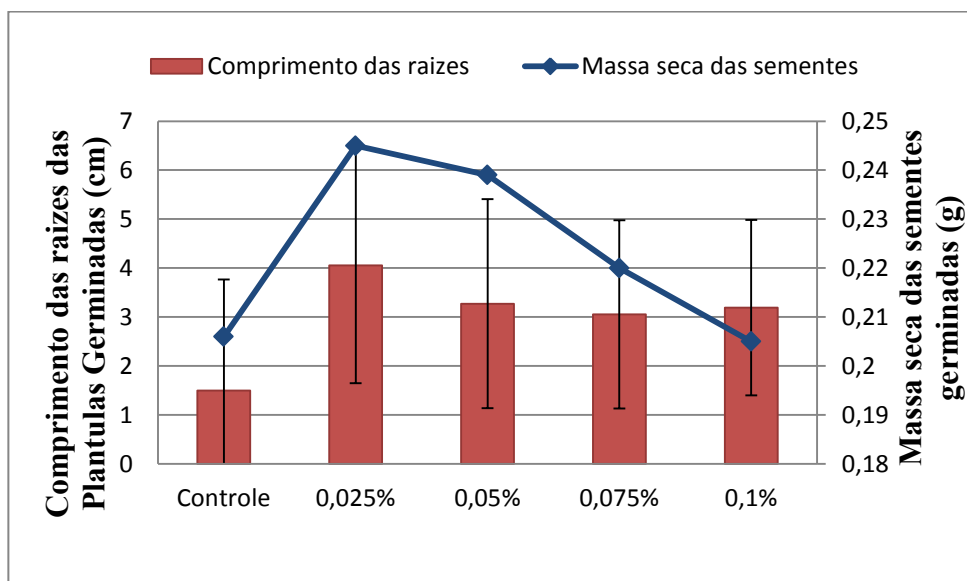
Figura 4-11: plântulas de *Glycine max* nos diferentes tratamentos após o termino do experimento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A figura 4-12 apresenta o crescimento radicular e a massa seca das plântulas de *Glycine max* ao termino do experimento.

Figura 4-12: comprimento médio das raízes e massa seca das plântulas germinadas de soja nos grupos experimentais: controle, 0,025 , 0,05, 0,075 e 1% p/V de ramnolipídios.



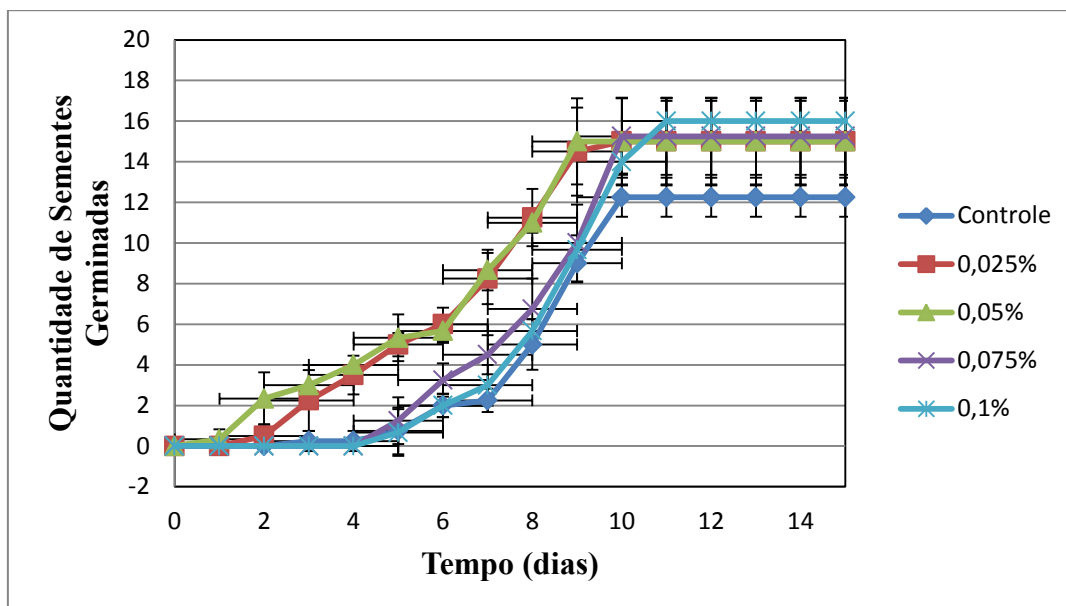
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A figura acima (Fig.4-12) nos permite inferir que a aplicação de ramnolipídios nas sementes de soja favoreceu o crescimento das raízes das plântulas durante o período observado, todas as concentrações de ramnolipídios apresentaram plântulas com raízes maiores que a do grupo controle, além disso o acúmulo de biomassa das plântulas de soja germinadas também foi favorecido pela aplicação do biotensoativo.

4.3.4 Germinação de sementes de girassol

A figura abaixo (Fig. 4-13) ilustra o numero acumulado de sementes de girassol germinadas ao longo do tempo.

Figura 4-13: Germinação acumulada de sementes de *Helianthus annuus* na presença de diferentes concentrações de ramnolipídios.



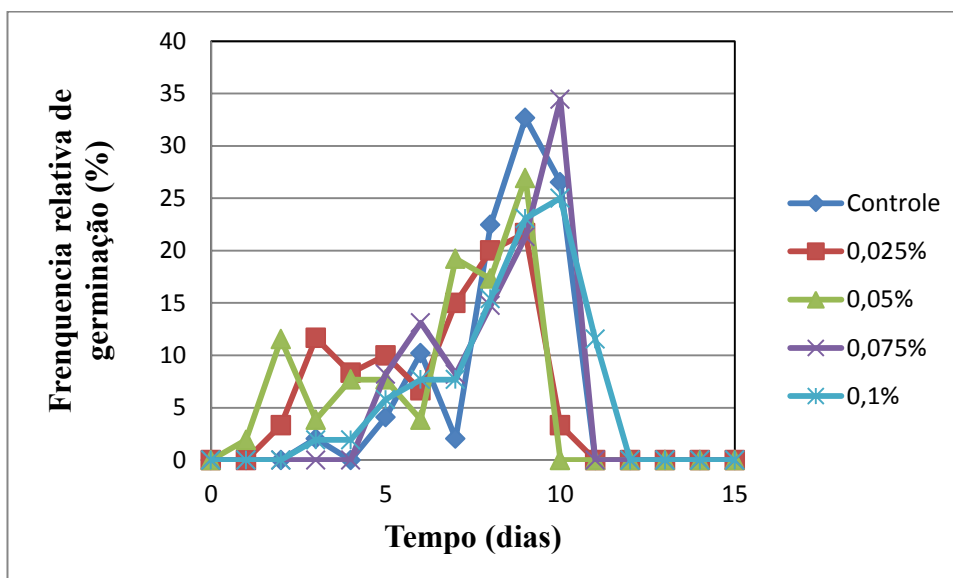
Fonte: Dados coletados pelo próprio autor.

Os tratamentos utilizando ramnolipídios favoreceram a germinação das sementes. Além disso nos grupos experimentais em que aplicou-se 0,025 , 0,05% p/v de ramnolipídios as sementes iniciaram o processo de germinação em um intervalo de tempo menor que o observado com o grupo controle e nos demais tratamentos. Quanto maior a concentração do biossurfactante empregada, maior foi à média de germinação das sementes de girassol, a maior quantidade média de sementes germinadas foram 16 sementes.

Os resultados obtidos utilizando ramnolipídios para a germinação de sementes de girassol assim como o trabalho realizado por Hurtt e Hodgson, (1987) demonstra que os tensoativos são capazes de favorecer a germinação de sementes.

A figura 4-14 apresenta os resultados da frequência acumulada de germinação das sementes de girassol ao longo do experimento.

Figura 4-14: Frequência relativa de sementes de girassol germinadas ao longo do tempo quando submetidas às soluções: controle, 0,025, 0,05 0,075 e 0,1% p/v de ramnolipídios.

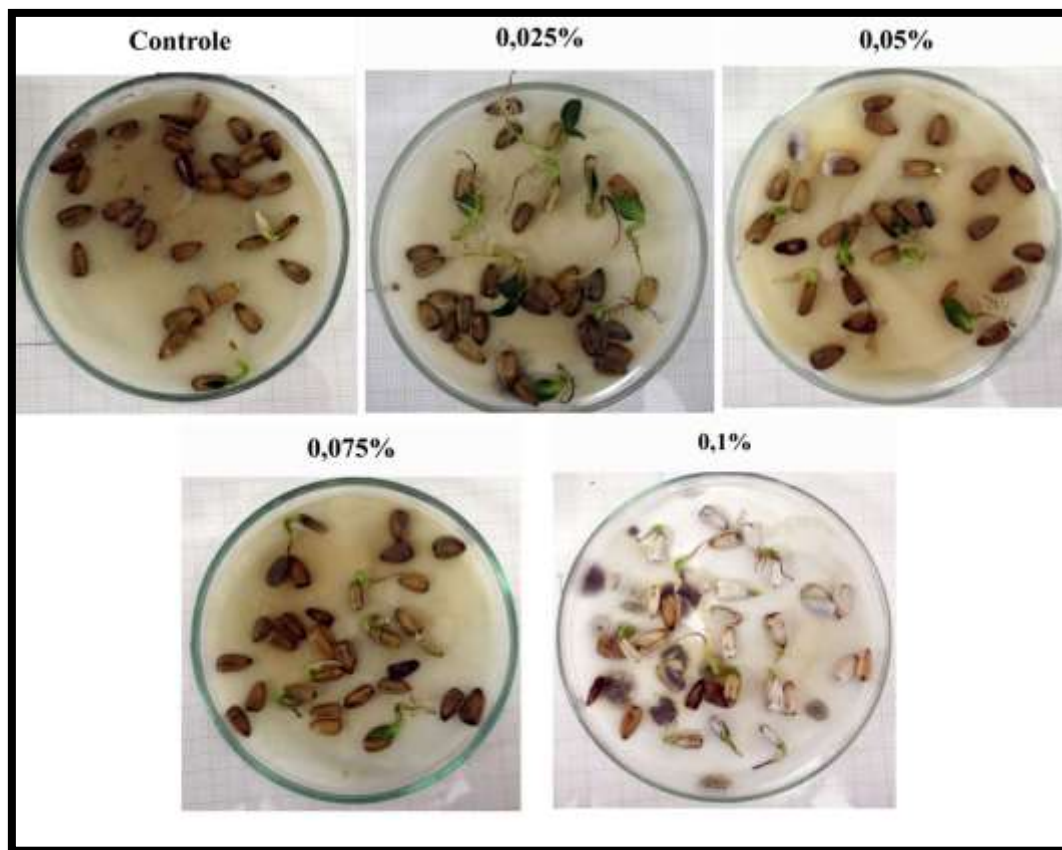


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A figura 4-14 permite uma visualização melhor do início da germinação da sementes nos diversos tratamentos, e assim como na Fig. 4-13 pode-se notar que nas concentrações 0,025 e 0,050 % p/v de ramnolipídios a germinação se iniciou antes do observado no grupo controle.

A figura 4-15 apresenta as plântulas de girassol germinadas nos diversos tratamentos.

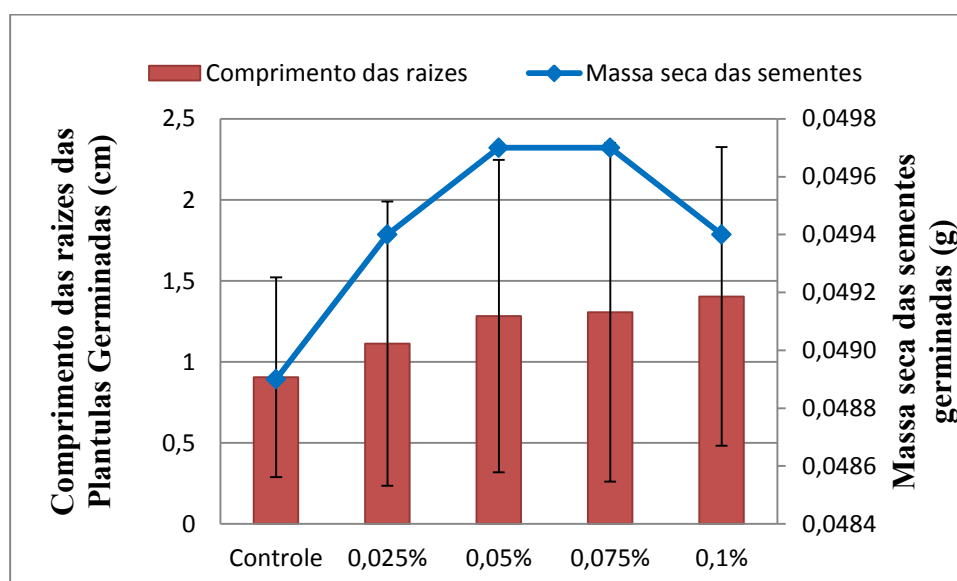
Figura 4-15: plântulas de *Helianthus annuus* nos diferentes tratamentos.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na figura 4-16 pode-se visualizar o crescimento médio das raízes das plântulas de girassol e a massa seca dessas plântulas.

Figura 4-16: comprimento médio das raízes das plântulas germinadas de girassol nos grupos experimentais : controle, 0,025 , 0,05, 0,075 e 1% p/V de ramnolipídios.



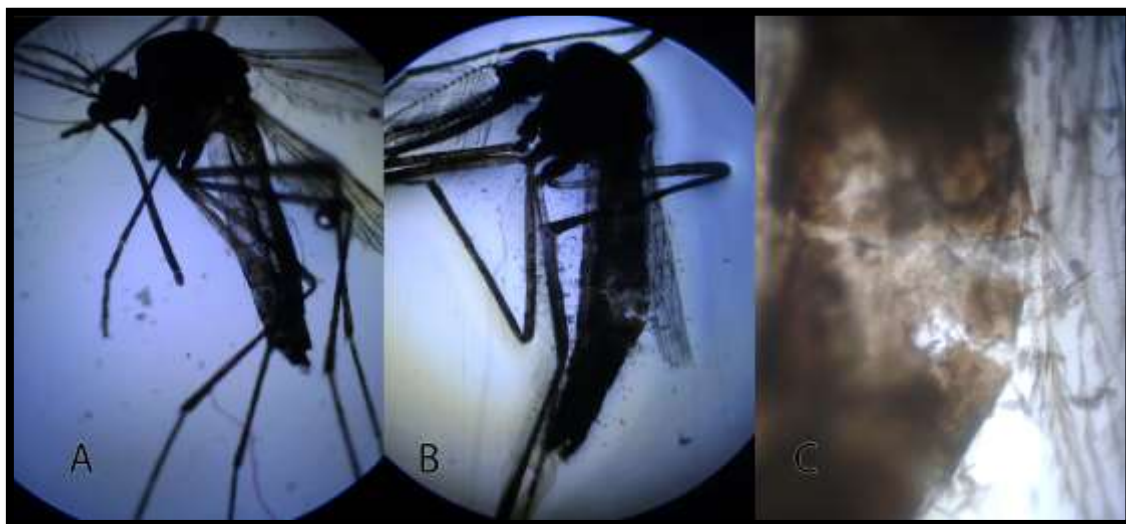
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As figuras 4-15 e 4-16 demonstram que para as sementes de girassol a aplicação de ramnolipídios não só favoreceu a germinação como também favoreceu o crescimento radicular das plântulas, que aumentou com a aplicação de ramnolipídios, assim como a massa seca das plântulas.

Segundo Krawczyńska, (2011) a aplicação de biossurfactantes como constituinte de um biopreparado favoreceu a germinação e o desenvolvimento de sementes de varias espécies de plantas, o efeito positivo dos biossurfactantes também foi observado no presente experimento favorecendo a germinação e o desenvolvimento das plântulas de girassol.

Os resultados desse capítulo demonstram que não só a concentração de ramnolipídios afetam a germinação das sementes e no crescimento e desenvolvimento das plântulas como também a espécie da planta influi nas respostas das sementes quando em contato com esse tensoativo. Esse fato provavelmente esta ligado aos possíveis mecanismos de ação do biossurfactante nas sementes, os ramnolipídios provavelmente agem nas membranas e cutículas das sementes, outra hipótese é que os ramnolipídios possam interagir com o tecido de reserva das sementes, ajudando a mobilizar o mesmo. Portanto são necessários estudos individuais dos cultivares antes do uso de biossurfactantes e surfactantes sintéticos na lavoura.

**5 CAPITULO III - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA E
REPELENTE DOS RAMNOLIPÍDIOS FRENTE A *Aedes aegypti*.**



5.1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito adaptada ao ambiente urbano, estando dessa maneira associado aos humanos. Eles procriam principalmente em ambientes artificiais contendo água parada (KYLE; HARRIS, 2008). Essa espécie de culicídeos possui uma grande importância médica, pois é o principal vetor do vírus da dengue e da febre amarela urbana no mundo (ELDRIDGE, 2005).

A dengue é atualmente uma das mais importantes arboviroses em humanos. Estima-se que ocorram entre 50 a 100 milhões de casos de dengue ao redor do mundo por ano, sendo entre 250.000 a meio milhão os casos mais severos como a dengue hemorrágica (GARELLI et al, 2013; KOURÍ et al, 2007; KROEGERAND; NATHAN, 2006). Essa doença causa cerca de 30.000 mortes ao redor do mundo anualmente (WHO, 2009).

Como ainda não existe uma vacina eficiente para a dengue, a principal forma de controle dessa doença é o controle da população do vetor (MORRISON et al, 2008), os principais inseticidas utilizados para o controle da população do mosquito são temefós para o controle larval e piretróides para o controle dos adultos (CHAVASSE; YAP, 1997).

Porém os potenciais efeitos negativos do uso de inseticidas químicos têm levado a uma busca por produtos menos nocivos ao ambiente (MITALL et al, 2003). Pesticidas biológicos produzidos por bactérias são eficazes contra mosquitos em dose baixas, não afetando outros agentes de controle biológicos (WALTON et al, 1992).

Recentemente Kim et al, (2011), relataram em seu trabalho o potencial dos ramnolipídios produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, em atuar como inseticida contra pulgões. Outro relato da atividade inseticida desse metabólito microbiano foi contra *Rhyzopertha dominica*, uma espécie de besouro conhecida por ser uma praga que ataca grãos armazenados, causando prejuízos ao setor agrícola (AHMED et al, 2012).

Os ramnolipídios são surfactantes biológicos, que apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, sendo dessa maneira pouco nocivos ao meio ambiente, portanto o presente estudo visa avaliar a atividade de repelência e inseticida desse metabólito microbiano. Verificando assim se os ramnolipídios podem ser bons substitutos para os inseticidas utilizados atualmente no controle de *Aedes aegypti*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo empregado nos experimentos realizados foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, o qual é proveniente de um banco de mutantes randômicos do Laboratório de Microbiologia Industrial – Depto de Bioquímica e Microbiologia – Unesp Rio Claro. Esse micro-organismo encontra-se acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% v/v, em freezer a -20°C.

5.2.2 Meio de cultura

5.2.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato

O meio de cultura utilizado possui a seguinte constituição em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,1; NaNO_3 - 1,5; 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; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 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.

Esse meio de cultura foi utilizado para o crescimento microbiano que serviu como inóculo para o biorreator, a fonte de carbono utilizadas para o crescimento microbiano foi de 125g/L de óleo de girassol.

5.2.2.2 Meio Mineral livre de cálcio

Para a produção de ramnolipídios em biorreator utilizou-se o seguinte meio (g/L): K_2HPO_4 - 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 1,0; NaNO_3 - 15. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizada foram os mesmos descritos no item anterior. A fonte de carbono empregada nessa etapa de trabalho foi 250g/L de óleo de girassol (LOVAGLIO, 2011).

5.2.3 Purificação do ramnolipídios produzido

Um volume do caldo livre de células foi misturado ao mesmo volume de n-hexano (1:1), agitou-se vigorosamente até completa homogeneização. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso, até que houvesse a separação das fases. Descartou-se a fase contendo n-hexano/ óleo e adicionou-se H_3PO_4 85% 1:100 (v/v) à fase aquosa, levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do tensoativo utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, 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.

5.2.4 Obtenção dos mosquitos

Os exemplares parentais de *Aedes aegypti* foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Santa Bárbara D'Oeste, São Paulo, Brasil, ainda em estágio larval e consistiam em 80 indivíduos.

5.2.5 Manutenção dos indivíduos

Os adultos de *Aedes aegypti* foram acondicionados em caixas plásticas de dimensões 25 x 27 x 35 cm, com a parte superior revestida por organza e com manga de tecido a fim de permitir manipulação posterior. As gaiolas plásticas contendo os indivíduos foram mantidas em uma sala climatizada a 27°C e foto período de 12 horas.

Para a alimentação dos adultos foi utilizada solução aquosa contendo 10% de glicose, essa solução era aplicada em um algodão hidrofílico, dentro de uma placa de vidro, para que os mosquitos não se afogassem.

5.2.6 Postura de ovos e manutenção larval

Com o intuito de obter ovos e larvas para a realização dos experimentos foram realizados repastos sanguíneo por 30 minutos, utilizando camundongo de laboratório (Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal pelo Protocolo nº: 3698, Decisão do CEUA Nº 022/2011).

As gaiolas onde as fêmeas do mosquito haviam realizado o repasto sanguíneo receberam então frascos de 600ml, contendo 300ml de água mineral, cada frasco continha uma paleta de madeira 12 x 4 cm, para as fêmeas oviporem. Após a postura dos ovos os frascos eram completados com água mineral até que os ovos ficassem submersos, e colocados em novas caixas plásticas.

As larvas emergiam 3 dias após a postura dos ovos e eram então alimentadas com ração para peixes (NETO; NAVARRO-SILVA, 2004).

5.2.7 Testes da ação larvicida dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

Os testes a fim de, verificar a ação do ramnolipídio frente às larvas de *A. aegypti* foram realizados da seguinte maneira. Frascos de 60ml receberam 40ml da solução a ser avaliada, os frascos foram tampados com tampas de rosca furadas permitindo a passagem de ar para os mesmos. Tais reservatórios receberam 10 larvas cada um.

As soluções avaliadas foram Controle (água mineral), 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 900 e 1000 mg/L de ramnolipídios purificados. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Durante a avaliação da atividade larvícida dos ramnolipídios foram quantificados o tempo de permanência médio das larvas na superfície, o tempo de permanência no fundo e o número de tentativas que a larva para permanecer na superfície.

5.2.8 Testes de repelência dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

Para os testes de repelência foram escolhidas algumas das concentrações que apresentaram melhor desempenho larvícida, além do controle, sendo elas: 400, 800 e 1000mg/L de ramnolipídios, as soluções foram aspergidas nos camundongos que serviriam para o repasto sanguíneo, cada animal recebeu 2.400 µL de solução, correspondente à 3 borrifadas (borrifador expelia 800µL de solução cada vez que fosse acionado). Os camundongos foram sempre anestesiados utilizando Quetamina (anestésico comercial), receberam uma marcação para distinguir o tratamento recebido. Cada gaiola continha um camundongo, correspondente a cada tratamento, o tempo de permanência dos camundongos na caixa foi de 40 minutos.

Observou-se a quantidade de mosquitos a pousar em cada um dos camundongos e qual o tempo que o mosquito permanecia exercendo hematofagia. Os testes foram realizados em 5 repetições. Cada gaiola continha 25 mosquitos adultos.

5.2.9 Testes da ação inseticida dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

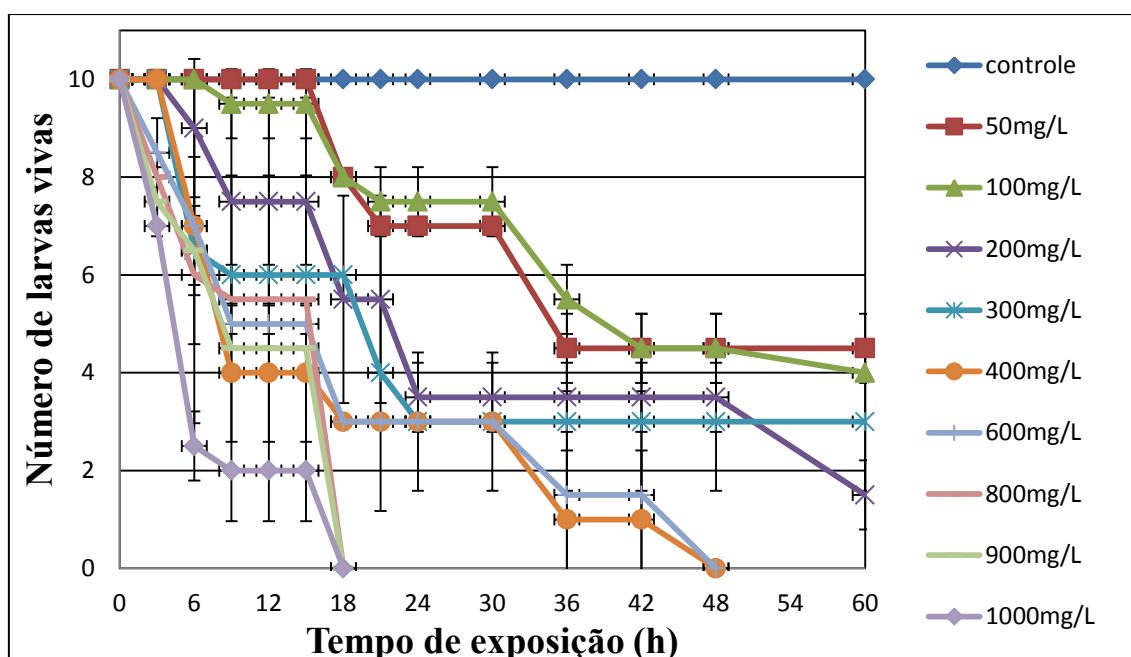
A ação inseticida nos indivíduos adultos foi avaliada borrifando os indivíduos com as soluções escolhidas e verificando o número de sobreviventes. As soluções avaliadas nessa etapa de trabalho foram as mesmas que no teste de repelência. O borrifador liberava 800µL a cada borrifada. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, cada gaiola continha 20 indivíduos adultos e recebeu 3.200 µL da solução a ser avaliada.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Ação larvicida dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

A Fig. 5-1 apresenta a quantidade de larvas vivas ao longo do tempo nos diversos tratamentos

Figura 5-1: número de larvas vivas ao longo do tempo nos diversos tratamentos.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como pode-se observar na figura 5-1, nos tratamentos em que se utilizou as concentrações de 1000, 900 e 800 mg/L todas as larvas foram mortas em até 18h de exposição. Nas concentrações de 600 e 400 mg/L de ramnolipídios a população de larvas foi reduzida a 0 com 48h de exposição às soluções de ramnolipídios. Durante o período observado as demais concentrações não foram capazes de eliminar 100% das larvas, porém todas elas apresentaram mortalidade superior a 50%, sendo que a solução contendo 50 mg/L apresentou a menor mortalidade, possuindo uma média de larvas vivas de 4,5 após 60h de exposição à solução de ramnolipídios.

Sabe-se que as larvas de *A. aegypti* possuem uma respiração traqueal, o sifão respiratório das mesmas está localizado na parte posterior do corpo, as larvas se mantem a um ângulo próximo a 90° com a superfície da água, com um desvio de 20°, variando

de acordo com o estágio larval. Nessa posição a região do sifão respiratório fica na interface entre a água e o ar, para que a larva execute as trocas gasosas (CHRISTOPHERS, 1960).

Christophers, (1960) relata que quando a tensão superficial da água está entre 27 e 36 mN/m² as larvas falham em permanecer na superfície, não conseguindo um contato adequado, para deixar o sifão respiratório na posição ideal.

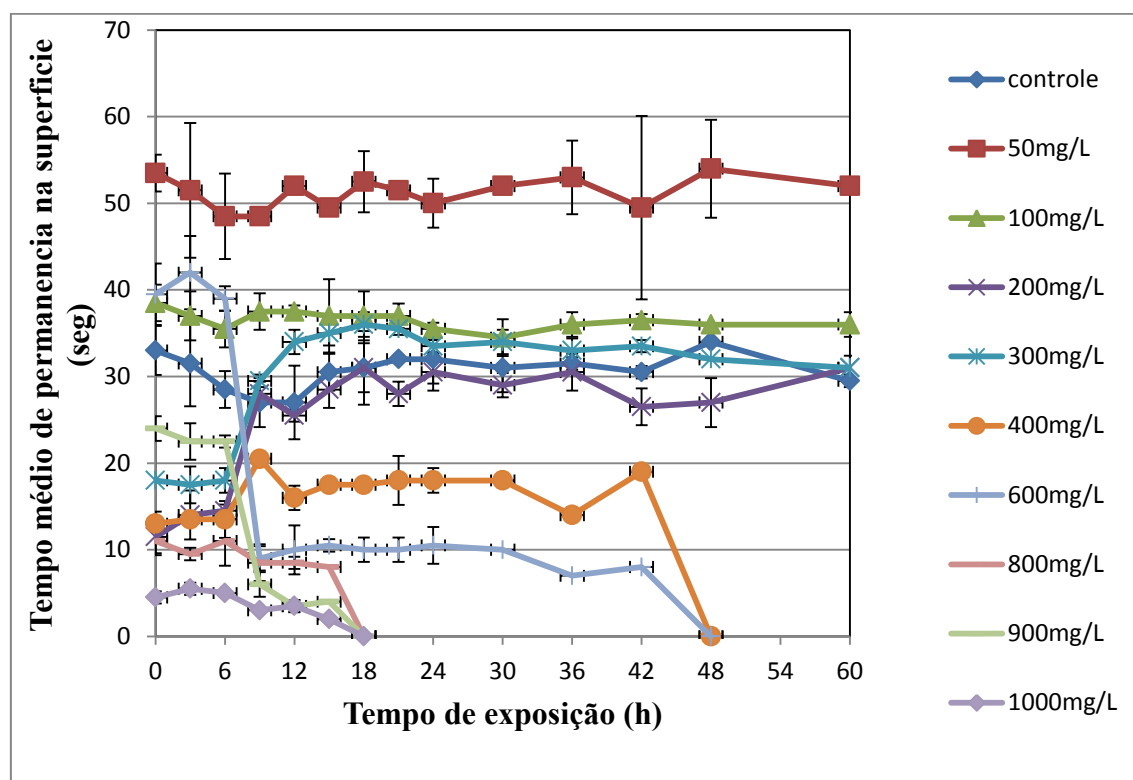
O mesmo pode ser observado em nossos experimentos, uma vez que as soluções contendo ramnolipídios utilizadas apresentam tensão superficial próxima a essa faixa (variando de 38,7 a 31,4 mN/m² de acordo com a concentração do biossurfactante), portanto o efeito larvícida do ramnolipídio pode estar relacionado à redução na tensão superficial, impossibilitando o correto posicionamento das larvas para as trocas gasosas.

Além disso o ápice do sifão respiratório das larvas possui em seu interior uma região de caráter fortemente hidrofóbico, isso aliado a uma secreção produzida nas glândulas peri-espiraculares são responsáveis por formar uma região não molhante quando a estrutura esta aberta e em contato com a superfície (CHRISTOPHERS, 1960).

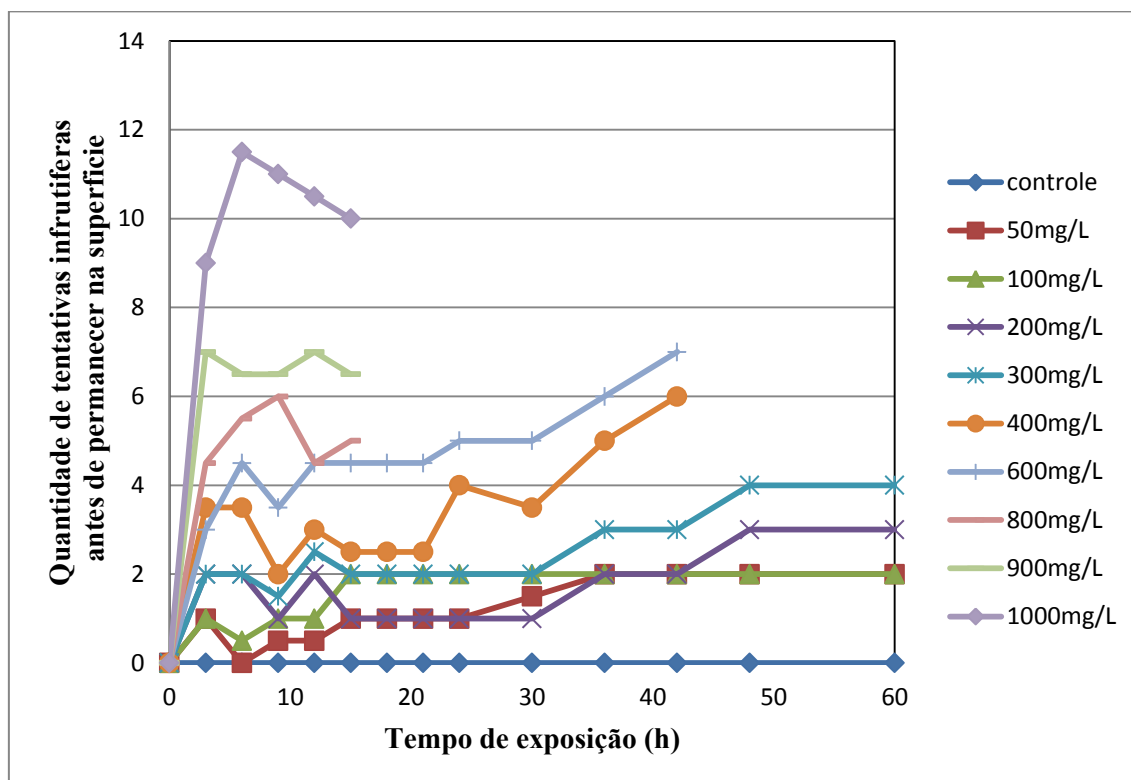
É possível que além de reduzir a tensão superficial, dificultando a respiração das larvas, os ramnolipídios interfiram nessa região hidrofóbica, localizada no ápice do sifão respiratório, alterando a capacidade molhante e possibilitando a entrada de água na abertura do espiráculo larval.

A fim de avaliar se esses fatores foram realmente responsáveis pela morte das larvas quantificou-se o tempo de permanência das larvas na superfície e o número de tentativas infrutíferas das mesmas em se fixar com a extremidade do sifão respiratório na interface água. Os resultados podem ser visualizados nas figuras 5-2 e 5-3 respectivamente.

Figura 5-2: Tempo de permanência das larvas na superfície.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5-3: número de tentativas sem sucesso das larvas em permanecer na superfície

Fonte: Elaborado pelo autor.

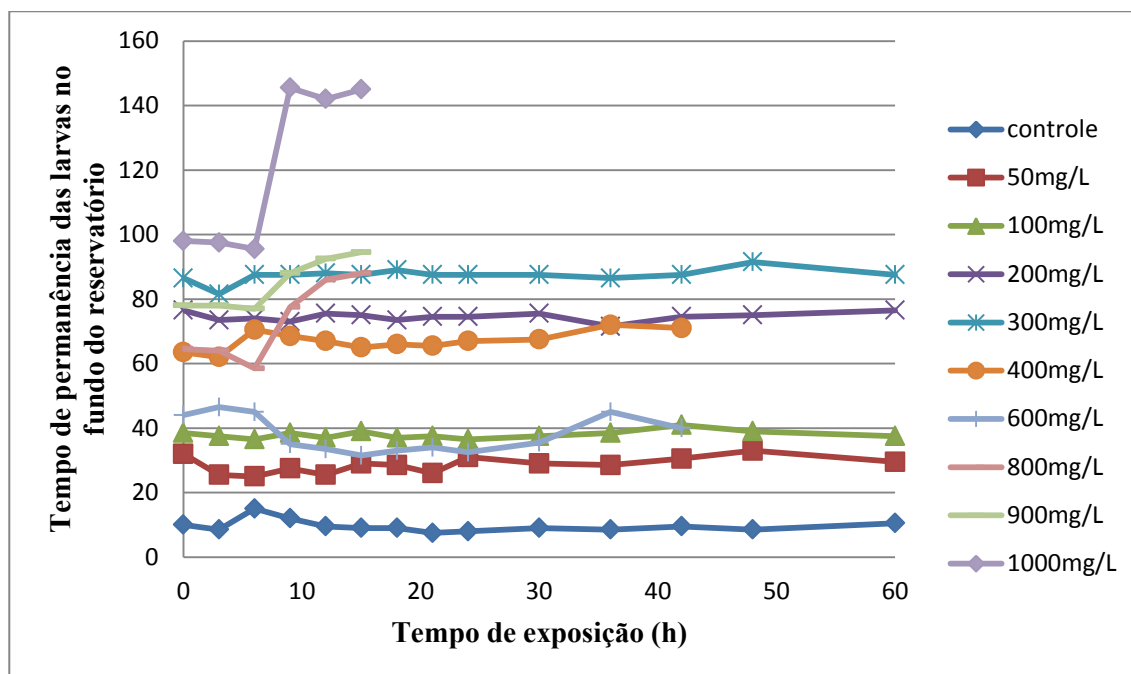
Pode-se visualizar na Fig.5-2 e Fig.5-3 que nas concentrações de 50 e 100mg/L de ramnolipídio as larvas tendem a permanecer por mais tempo na superfície que no tratamento controle, porém a eficiência das mesmas em manter o sifão respiratório na interface água/ ar é menor, uma vez que as larvas de *A. aegypti* submetidas a essas concentrações de ramnolipídio necessitam de mais de uma subida a superfície para conseguirem se manter na posição correta afim de executar as trocas gasosas.

Nas concentrações em que se utilizou 200 e 300 mg/L de ramnolipídios, verificou-se um aumento no tempo de permanência na superfície após 9 horas de exposição ao ramnolipídio, sendo esse tempo de permanência próximo ao do controle.

Já nas concentrações superiores a 400mg/L o tempo de permanência na superfície após 9h de observação foi visivelmente menor que o observado no controle, tais tratamentos apresentaram também um número de tentativas infrutíferas das larvas em se fixarem na superfície superior às demais concentrações. A partir dessa concentração, o número de tentativas aumenta concomitantemente à concentração de ramnolipídio empregada.

Outro fator avaliado no presente estudo foi o tempo de permanência das larvas no fundo, o que nos dá indício da perda atividade das mesmas. (Fig 5-4).

Figura 5-4: Tempo de permanência das larvas no fundo do reservatório.



Fonte: elaborado pelo autor.

As larvas cujo tempo de permanência no fundo do reservatório foi menor, portanto apresentaram maior atividade, foram as larvas do grupo controle (em média 30,6 seg).

Os indivíduos submetidos às concentrações de 50, 100, 200 e 300 mg/L apresentaram um tempo de fundo praticamente estável ao longo do experimento, sendo os tempos médios desse tratamentos 28,6; 37,9; 74,5 e 87,3 segundos respectivamente.

Nos tratamentos cuja concentração aplicada foram de 1000, 900 e 800mg/L é visível um aumento no tempo de fundo das larvas até a morte das mesmas, indicando um diminuição gradual da atividade dos indivíduos submetidos a tais tratamentos, da Costa Lima, (1914) relata que as larvas de *A. aegypti* podem sobreviver por longos períodos submersas chegando a até 53 dias, portanto as mortes das larvas provavelmente não foram causadas pelo tempo de submersão, porém é possível que nessas concentrações o biossurfactante tenha quebrado o sensível balanço hidrostático entre a larva e a água.

Segundo Christophers, (1960), as larvas de *A. aegypti* devido aos espaços de ar em seu corpo possuem uma gravidade específica muito próxima a da água, o que é evidenciado, pois quando o sifão respiratório da larva esta na interface água ar quase não há formação de um funil de depressão, o autor relata ainda que esse fato facilita à volta da larva a superfície. O que faz com que a gravidade específica da larva de *A. aegypti* seja semelhante a da água é o formato de sua traqueia e dos troncos traqueais (CHRISTOPHERS, 1960), por tanto a entrada de água na traqueia devido a quebra na tensão superficial e alteração da capacidade molhante na região do sifão respiratório alteraria esse balanço, dificultando a volta da larva a superfície, e gerando um maior gasto de energia para que a mesma realizasse o percurso do fundo para a superfície.

Já nos tratamentos utilizando 400 e 600 mg/L de ramnolipídios pode-se observar uma redução no tempo em que as larvas permaneceram no fundo próximo ao tempo de morte desses indivíduos, o que pode ser proveniente de um esforço maior para atingir a superfície, aliado a esse esforço observa-se um aumento no número de tentativas mal sucedidas das larvas desses tratamentos em permanecer na superfície.

5.3.2 Efeito inseticida dos ramnolipídios em adultos

Os resultados dos testes realizados a fim de verificar a ação inseticida do ramnolipídios frente aos mosquitos adultos podem ser observados na tabela 5-1.

Tabela 5-1: Número de adultos de *A. aegypti* vivos nos diferentes tratamentos.

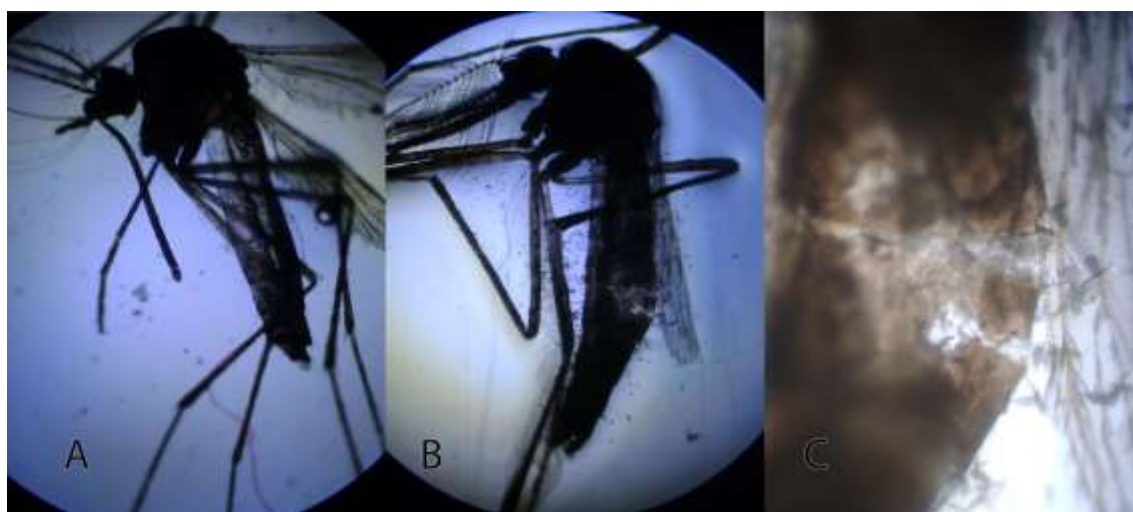
	Número de mosquitos	
	vivos	Desvio
controle	18,33	1,53
400mg/L	2,67	0,58
800mg/L	1,33	0,58
1000mg/L	0,00	0,00

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Pode-se verificar que todas as concentrações avaliadas, os ramnolipídios apresentaram atividade inseticida contra os adultos, e que a concentração de 1000mg/L foi suficiente para reduzir a população de *A. aegypti* a zero.

Acredita-se que os ramnolipídios tenham agido na cutícula dos mosquitos, causando o rompimento da mesma, levando os a morte. A Fig. 5-5A é uma micrografia de um indivíduo controle e de um indivíduo exposto à solução com 1000mg/L de ramnolipídios (Fig. 5.5B).

Figura 5-5: (A) *A. aegypti* submetido ao tratamento controle (aumento de 50x), (B) *A. aegypti* submetido a solução contendo 1000mg/L de ramnolipídios (aumento 50x) e (C) região do indivíduo retratado em (B) com um aumento do 100x.



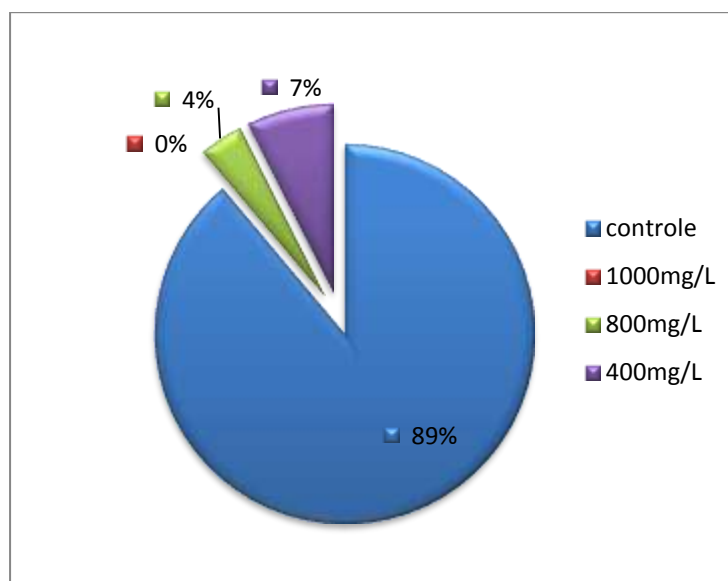
Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode-se observar na figura 5-5B e 5-5C uma região do corpo do mosquito, que foi submetido ao tratamento com ramnolipídios, onde é possível visualizar o rompimento cuticular do mosquito, o mesmo foi observado pelos pesquisadores (KIM et al, 2012), em seus estudos avaliando a atividade inseticida do ramnolipídios frente a pulgões.

5.3.3 Repelência dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

Foram realizados também testes a fim de verificar se os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* possuem capacidade de repelência, a Fig. 5-6 apresenta a quantidade média de mosquitos pousados nos camundongos em cada tratamento.

Figura 5-6: Porcentagem média de mosquitos pousados em cada tratamento.



Fonte: Dados coletados no presente trabalho.

Pode-se verificar que os mosquitos apresentaram maior incidência de pouso, nos camundongos do grupo controle realizando a alimentação nesses camundongos em 89% das vezes. Quando o camundongo foi borrifado com a solução contendo 1000 mg/L de ramnolipídios, nenhum mosquito pousou sobre ele, o que indica uma possível atividade de repelência desse biossurfactante.

Outro fator avaliado foi o tempo de permanência dos mosquitos durante a alimentação nos diferentes tratamentos.

Tabela 5-2: Tempo médio de permanência dos mosquitos sobre os camundongos em minutos.

	Tempo médio de permanência dos mosquitos sobre o camundongo (min)		Desvio Padrão
Controle	23,08		1,65
1000mg/L	0,00		0,00
800mg/L	1,18		1,36
400mg/L	5,15		3,28

Fonte: Dados coletados no presente trabalho.

Como apresentado na tab.5-2 além de diminuir a quantidade de mosquitos que se alimentam dos camundongos, o metabólito microbiano produzido por *P. aeruginosa* reduz o tempo de alimentação dos mosquitos.

Segundo Davis et al, (2013) compostos orgânicos voláteis produzidos por micro-organismos estão relacionados ao comportamento alimentar de insetos, e podem ser poderosos repelentes. Mosquitos podem utilizar esses compostos microbianos para localizar sua fonte de alimento (VERHULST et al, 2009), os odores produzidos por *P. aeruginosa* não são atrativos para os mosquitos *Anopheles gambiae* por exemplo (VERHULST et al, 2010).

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* não são compostos voláteis, porém emitem um odor característico, no presente trabalho levanta-se a hipótese de que os adultos de *A. aegypti* captem o cheiro desse biotensoativo, e que esse odor seja repelente para os mosquitos, o que está de acordo com observado no experimento realizado.

6 CONCLUSÃO

- O óleo de soja é um bom substrato para a produção de ramnolipídios, pois houve alta produção de ramnolipídios e produtividade satisfatória.
- O emprego do cultivo em batelada alimentada, nas condições utilizadas neste trabalho, não foram eficientes para aumentar a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1.
- Os homólogos de ramnolipídios produzidos foram influenciados pela fonte de carbono.
- A adição de ramnolipídios favorece a germinação das sementes de alface, porém prejudica o desenvolvimento das plântulas.
- As sementes de milho tem sua germinação e crescimento favorecidos quando as concentrações de biossurfactante empregadas são de 0,025 e 0,05% p/v,.
- A germinação das sementes de soja não é afetada pela adição de ramnolipídios, porém as plântulas tem seu crescimento radicular e o aumento da massa seca favorecidos por esse bioproduto.
- Dentro das concentrações de ramnolipídios avaliadas todas favoreceram a germinação das sementes, o crescimento radicular e o ganho de biomassa das plântulas de girassol.

- Os rhamnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 possuem atividade larvívica contra larvas de *Aedes aegypti*.
- O metabólito microbiano avaliado possui atividade insetívica contra adultos de *Aedes aegypti*.
- O biotensioativo produzido por *P. aeruginosa* LBI 2A1 é um substituto potencial para os insetívicos empregados no controle populacional desse vetor da dengue e da febre amarela.
- O rhamnolipídio apresenta atividade de repelência frente a *Aedes aegypti*.

7 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.

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.

AHMED, K.; SHAIK, A. B.; KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; RANI, P. U.; KRISHNA, K.V.S. R.; MAMIDYALA, S. K.; JOSEPH, J. Metabolic Profiling and Biological Activities of Bioactive Compounds Produced by *Pseudomonas* sp. Strain ICTB-745 Isolated from Ladakh, India. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 22, p.69–79, 2012.

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.

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

AWASTHI N, KUMAR A, MAKKAR R, CAMEOTRA SS Bio-degradation of soil-applied endosulfan in the presence of a biosurfactant. **J Environ Sci Health** v.34 p.793–803, 1999.

BANAT I.M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of art. **Acta Biotechnol** v.15 p. 251-267, 1995.

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.; 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.

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.

CALFEE, M. W.; SHELTON, J. G.; MCCUBREY, J. A.; PESCI, E. C. Solubility and Bioactivity of the *Pseudomonas* Quinolone Signal Are Increased by a *Pseudomonas aeruginosa* Produced Surfactant. **infection and immunity**, p. 878–88 ,2005.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Oxford, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules **Current Opinion in Microbiology** v. 7 p.262–266, 2004.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactants in agriculture **Appl Microbiol Biotechnol** v.97 p.1005–1016, 2013.

CHAVASSE DC, YAP HH; Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. **World Health Organization**, Geneva, 1997.

CHRISTOPHERS SR *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics, and structure. **Cambridge University Press, London**, p 739, 1960.

CHYZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World J Microbiol Biotechnol** v. 28 p.401–419, 2012.

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

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE M, LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry** v.45 p.1511–1516, 2010.

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

DEZIEL, E.; LEPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMER, O. A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1440, 244-252, 1999.

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.

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.

DA COSTA LIMA, S. Contribution to the biology of the Culicidae. Observations on the respiratory process of the larva. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 6, p.18-34, 1914.

DAVIS, T.S; CRIPPEN, T.L; HOFSTETTER, R. W; TOMBERLIN, J. K. Microbial Volatile Emissions as Insect Semiochemicals **J Chem Ecol** v. 39 p.840–859, 2013.

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

DUNAEVA, MV; ZAK, EA; KLYACHKO, NL. "effects of different classes of surfactants on germination of wheat seeds during water deficiency" **soviet plant physiology** V.39 p.104-109, 1992.

ELDRIDGE, B.F. Mosquitoes, the culicidae. In: Marquardt WH (ed) **Biology of disease vectors**, Elsevier Academic, Burlington, p. 95–113, 2005.

FOLGERH, T.; The reactions of *Culex* larvae and pupae to gravity, light and mechanical shock. **Physiol. Zool.** V.19, p.190-202, 1946.

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.

GARELLIA, F. M.; ESPINOSAB, M. O.; GÜRTLERA, R. E.; Spatial analysis of *Aedes aegypti* immatures in Northern Argentina: Clusters and temporal instability **Acta Tropica** v.128, p.461– 467, 2013.

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

GOMES, M. Z. V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control** v.25 p.441-447, 2012.

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.

GUNSTONE, F. D. **Oils and fats in the market. Place prices of commodity oils.** Disponivel em < <http://lipidlibrary.aocs.org/market/prices.htm> > acesso em 15 Jan. 2013.

ISODA, H.; KITAMOTO, D.; SHINMOTO, H.; MATSUMOTO, M.; NAKAHARA, T.; Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.61 p.609-614, 1997.

HURTT, W.W.; HODGSON H. R. Effects of Nonionic Surfactants, Temperature, and Light on Germination of weed seeds. **Weed Science** p. 52-57 v. 35, 1987.

HEYDECKER, W. AND COOLBEAR, P. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. **Seed Science and Technology**, v.5, p.353-425, 1977.

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

KRAWCZYŃSKA, M.; KOŁWZAN, B.; RYBAK, J.; GEDIGA, K.; SHCHEGLOVA, N.S. The Influence of Biopreparation on Seed Germination and Growth **Pol. J. Environ. Stud.** v.21, p.1697-1702, 2012.

KIM, B.S.; LEE, J.Y.; HWANG, B.K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. **Pest Manage. Sci.** v.56, p.1029–1035, 2000.

KIM, S.K, KIM, Y.C, LEE, S, KIM, J.C. YUN MY, KIM IS. Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas sp.* EP-3 against Green Peach Aphid (*Myzus persicae*). **J. Agric. Food Chem**, v.59, p.934 – 938, 2011.

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.

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.

KYLE, J.L., HARRIS, E., . Global spread and persistence of dengue. **Annual Review of Microbiology** v.62, p.71–92, 2008.

KROEGER, A., NATHAN, M.B., Dengue: setting the global research agenda. **Lancet** v.368, p.2193–2195, 2006.

KOURÍ, G.I., PELEGRINO, J.L., MUNSTER, B.M., GUZMÁN, M.G., Sociedad, economía, inequidades y dengue. **Rev Cubana Med Tro**, p59, 2007.

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.

LINHARDT RJ, BAKHIT R, DANIELS L, MAYERL F, PICKENHAGEN W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnol Bioeng** V.33P.365–368, 1989

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.

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.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**. v. 30, n. 11, p. 558-564, 2012.

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.** 155, p.249-256, 2001.

MCGINLEY M.; MOTT J. Bioethanol Production Monitoring using Ion Exclusion HPLC with Rezex™ ROA Column. **Application HPLC**, 2008.

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.

MÜLLER, M.M; HAUSMANN, R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid

biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. **Appl Microbiol Biotechnol** v.91 p.251 –264, 2011.

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.

MORRISON, A.C., ZIELINSKI-GUTIERREZ, E., SCOTT, T.W., ROSENBERG, R., Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. **PLoS Medicine** v.5, e68, 2008.

MITTAL, P.K.; Biolarvicides in vector control: challenges and prospects, **J. Vector Borne Dis**. v. 40 p.20–32, 2003.

NETO, P.L.; NAVARRO-SILVA, M.A. Development, longevity, gonotrophic cycle and oviposition of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) under cyclic temperatures. **Neotrop. Entomol**, 33: 29-33, 2004.

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, 2005a.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnol. Prog**, New York, v. 21, p. 1593-1600, 2005 b.

OCHSNER, U. A.; KOCH, A.K.; FIECHTER, A.; REISER, J.T. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol**, Washington, v. 176, p. 2044 – 2054, 1994.

PALANISAMY, P.; RAICHUR, A.M. Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique. **Mater Sci Eng. C Biomim. Supramol. Syst.**, v. 29, p. 199-204, 2009.

PILJAC A, STIPCEVIĆ T, PILJAC-ZEGARAC J, PILJAC G. Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1% dirhamno lipid ointment. *J. Cutan. Med. Surg.* V.12, p.142–146, 2008.

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.

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 Micro biol Biotechnol** v.52 p.154-162, 1999.

SANCHEZ, L.; COURTEAUX , B.; HUBERT, J.; KAUFFMANN, S.; RENAULT, J.; CLÉMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY S. rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in arabidopsis and highlighta central role for salicylic acid. **Plant Physiology**, v.160, p. 1630 – 1641, 2012.

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.

SALWA, M. S.; NUR ASSHIFA, M. N.; AMIRUL, A. A.; AHMAD R. M. Y. Different Feeding Strategy for the Production of Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* USM AR2 in Modified Bioreactor. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.14 p. 763-768, 2009.

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

SHA, R.; JIANG, L.; MENG, Q.; ZHANG G.; SONG, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. **Journal of Basic Microbiology**, v.52, p.458 – 466, 2012.

SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, v. 79, p. 174 – 183, 2010.

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.

SPURRIER, E. C. AND J. A. JACKOBS. Some effects of an anionic sodium sulfonate type surfactant upon plant growth. **Agron. J.** p. 462-465, 1955.

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, 1985a.

STIPCEVIC, T.; PILJAC, A.; PILJAC, G.; Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. *Burns* v.32, p.24–34, 2006.

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of 4 interfacial active rhamnolipids from normal-alkanes or glycerol by resting cells of *pseudomonas* species dsm 2874. **Zeitschrift fur Naturforschung c-a Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 40, n. 1-2, p. 61-67, 1985b.

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.

TRUMMLER K, EFFENBERGER F, SYLDATK C An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp DSM 2874. **Eur J Lipid Sci Technol** v.105 p.563–571,2003.

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.

VARNIER, A.L. et al. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell Environ**, v. 32, p. 178-193, 2009.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. **int. J. Mol. Sci**, v.11 p.5095-5108, 2010.

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.

VERHULST NO, BEIJLEVELD H, KNOLS BG, TAKKEN W, SCHRAA G, BOUWMEESTER HJ, SMALLEGANGE RC. Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes. *Malaria J*, 2009.

VENKATESH, N. Y. M.; VEDARAMAN N. Remediation of soil contaminated with copper using Rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* TCC 2297 using waste frying rice bran oil **Ann Microbiol** p.62-85, 2012.

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**, p. 129 – 158, 2008.

WINSON, M.K.; et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 92, p. 9427 – 9431, 1995.

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.

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

World Health Organization, 2009. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever; fact sheet 117. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/.

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 2003.

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

ZHU, L. ; YANG, X.; XUE, C.; CHEN, Y.; QU, L.; LU, W. Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. **Bioresource Technology** p.208–213, 2012.