



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**A INFLUÊNCIA DOS ELEMENTOS TRAÇOS, (B, Cu, Mn, Mo e Zn) NA
PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI.**

TULIO DE LUCCA CAPELINI

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas (Microbiologia Aplicada).

TULIO DE LUCCA CAPELINI

**A INFLUÊNCIA DOS ELEMENTOS TRAÇOS, (B, Cu, Mn, Mo e Zn) NA
PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI.**

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

Orientador: Jonas Contiero

Co-orientadora: Roberta Barros Lovaglio

Rio Claro

2012

576 Capelini, Tulio de Lucca
C238i A influência dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn)
na produção de Ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa*
LBI / Tulio de Lucca Capelini. - Rio Claro : [s.n.], 2012
75 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Microorganismos. 2. Óleo de soja. 3. Glicerina. 4.
Cobalto. 5. Citrato. I. Título.

“O essencial é invisível aos olhos.”
Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Os biossurfactantes são metabólitos secundários que apresentam atividade de superfície, podendo ser aplicados em diferentes processos industriais, como produção de fármacos, compostos químicos, cosméticos, biorremediação de ambientes poluídos por petróleo e derivados e recuperação terciária do petróleo. A maior vantagem destes compostos quando comparado aos surfactantes sintéticos reside na sua diversidade estrutural, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade. Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelos biotensoativos, eles não são tão comercialmente utilizados devido ao alto custo de produção, uma maneira de se diminuir estes custos, seria a otimização dos compostos do meio e utilização de substratos alternativos mais baratos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência de elementos traço na produção de ramnolipídios por de *P. aeruginosa* LBI a partir de duas fontes de carbono diferentes (uma hidrofóbica - óleo de soja - e outra hidrofílica - glicerina P.A.) Na primeira etapa do trabalho foi avaliado o perfil de produção de ramnolipídios em diferentes concentrações dos elementos traço. Em seguida, foram realizadas fermentações para inferir a importância individual de cada elemento traço no cultivo. E ao final foi testada a adição de novos elementos aos ensaios, com o intuito de avaliar seus resultados quanto à mudança na cinética de produção dos biossurfactantes. O trabalho comprovou que os elementos boro, citrato, cobalto, cobre, manganês, molibdênio e zinco exercem influência na produção de ramnolipídios, sendo está, em alguns casos positiva, em outros, negativa.

Palavras-chaves: biossurfactantes; ramnolipídios; *Pseudomonas aeruginosa*; elementos traço, íons.

ABSTRACT

The biosurfactants are secondary metabolites that exhibit surface activity and can be applied in different industrial processes such as production of pharmaceuticals, chemicals, cosmetics, bioremediation of polluted environments by oil and derivatives and tertiary recovery of oil. The greatest advantage of these compounds compared to synthetic surfactants lies in their structural diversity, low toxicity and high biodegradability. Despite the numerous advantages provided by biosurfactants, they are not commercially used due to the high cost of production, a way to reduce these costs, is the optimization of the compounds of the medium and the use of cheaper alternatives substrates. Therefore, the objective of this work was study the influence of trace elements in the rhamnolipids production by *P. aeruginosa* LBI from two different carbon sources (a hydrophobic - soybean oil - and a hydrophilic – glycerin P.A.). In the first stage of the study was evaluated the profile of rhamnolipids production at different concentrations of trace elements. Then, fermentations were carried out to infer the importance of each individual trace element in the culture. And at the end, were tested the addition of new elements to the medium, to availed their changes in the kinetics of production of biosurfactants. The work confirmed that the elements boron, citrate, cobalt, copper, manganese, molybdenum and zinc influencing the production of rhamnolipids, being in some cases positively, and in others negative.

Key words: biosurfactant; rhamnolipids; *Pseudomonas aeruginosa*; trace elements; ions.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estruturas dos principais homólogos de ramnolipídios (RL1, RL2, RL3 e RL4), produzidos por <i>P. aeruginosa</i>	16
Figura 2: Principais campos de pesquisa, eventos e descobertas no campo dos ramnolipídios. Modificado de Chrzanowski, Lawniczak e Czaczyk (2012)...	17
Figura 3: Proposta das rotas metabólicas envolvidas na produção de ramnolipídios pela <i>P. aeruginosa</i> , tendo óleo de soja ou glicerina como fonte de carbono. Modificado de Abdel-Mawgoud et al. (2011).....	25
Figura 4: Parte da regulação gênica envolvida na biossíntese dos ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> . Modificado de Abdel-Mawgoud et al., (2011) e Reis et al., (2011).....	27
Figura 5: CCD para verificação da produção de ramnolipídios nos cultivos com óleo (A) e glicerina (B). Ácidos Graxos (AG), Di-ramnolipídios (DiRL) e Mono-ramnolipídios (MnRL).	38
Figura 6: Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando óleo de soja como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, em diferentes concentrações (µL/L) de solução de elementos traço no meio, 50 (B), 500 (C), 1.000(D), 1.500(E), 2.000 (F), 2.500(G) e 3.000 (H).....	39
Figura 7: Produção de ramnolipídio (mg/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.....	40

Figura 8: Biomassa (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.....	42
Figura 9: Consumo de óleo (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.....	43
Figura 10: Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando óleo de soja como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com ausência de cada um dos elementos traços, boro (B), cobre (C), manganês (D), molibdênio (E) e zinco (F).....	43
Figura 11: Produção de ramnolipídio (mg/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).....	44
Figura 12: Biomassa (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada na ausência de cada um dos elementos traços(B, Cu, Mn, Mo e Zn).....	45
Figura 13: Emulsão (E) presente no processamento da amostra, que impossibilitou um volume suficiente de n-hexano (H) para análise de óleo residual.....	46
Figura 14: Consumo de óleo (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).....	47

Figura 15: Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando óleo de soja como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com a adição de citrato (B), cobalto (C) e ambos (D).....	47
Figura 16: Produção de ramnolipídio (mg/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.....	48
Figura 17: Biomassa (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.....	49
Figura 18: Consumo de óleo (mg/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.....	50
Figura 19: Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando glicerina P.A. como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, em diferentes concentrações (µL/L) de solução de elementos traço no meio, 50 (B), 500 (C), 1.000(D), 1.500(E), 2.000 (F), 2.500(G) e 3.000 (H).....	51
Figura 20: Produção de ramnolipídio (mg/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.....	51
Figura 21: Biomassa (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.....	53

Figura 22: Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando glicerina P.A. como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com ausência de cada um dos elementos traços, boro (B), cobre (C), manganês (D), molibdênio (E) e zinco (F).....	54
Figura 23: Produção de ramnolipídio (mg/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).....	55
Figura 24: Biomassa (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).....	56
Figura 25: Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando glicerina P.A. como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com a adição de citrato (B), cobalto (C) e ambos (D).....	57
Figura 26: Produção de ramnolipídios (mg/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.....	58
Figura 27: Cinética da produção de biomassa (g/L) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.....	58

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Micronutrientes (elementos traços) necessários aos micro-organismos.....	30
Tabela 2: Concentrações dos íons no meio, nas diferentes concentrações da solução traço adicionadas ao meio de cultivo.....	33
Tabela 3: Concentrações dos íons traço nos meio nas diferentes condições de cultivo estabelecidas para a avaliação da influência dos elementos traços na produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI.....	34
Tabela 4: Concentrações dos íons traço nos meio nas diferentes condições de cultivo estabelecidas para a avaliação da influência do citrato e cobalto na produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI.....	34
Tabela 5: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em óleo de soja e diferentes volumes de solução de elementos traço.....	41
Tabela 6: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em óleo de soja e ausência de cada um dos elementos traço.....	45
Tabela 7: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em óleo de soja e adição de citrato e/ou cobalto.....	48

Tabela 8: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em glicerina P.A. e diferentes volumes de solução de elementos traço..... **52**

Tabela 9: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em glicerina P.A. e ausência de cada um dos elementos traço..... **55**

Tabela 10: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em glicerina P.A. e adição de citrato e/ou cobalto..... **57**

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Surfactantes.....	15
2.2. Biossurfactantes.....	15
2.3. Histórico dos Ramnolipídios e <i>P. aeruginosa</i>	17
2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.5. Aplicação comercial dos biossurfactantes.....	20
2.6. Funções fisiológicas.....	22
2.7. Estratégias de produção de biossurfactantes.....	23
2.8. Biossíntese de ramnolipídios.....	23
2.9. Regulação gênica da produção dos ramnolipídios.....	26
2.10. Fontes alternativas de carbono na produção de biossurfactantes.....	28
2.11. Influência de elementos traços na produção de ramnolipídios.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Micro-organismo.....	32

4.2. Meio de cultura e condições de cultivo.....	32
4.2.A. Meio de cultura para o pré-cultivo.....	32
4.2.B. Meio de cultura para produção dos ramnolipídios.....	32
4.2.C. Fontes de carbono.....	32
4.2.D. Preparo do pré-inóculo e condições de cultivo.....	32
4.3. Processamento das amostras.....	34
4.4. Métodos Analíticos.....	35
4.4.1. Avaliação da produção de Ramnolipídios.....	35
4.4.1.A. Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada.....	35
4.4.1.B. Determinação da concentração de Ramnolipídios – HPLC.	35
4.4.1.B.1. Derivatização.....	35
4.4.1.B.2. HPLC.....	36
4.4.2. Determinação da biomassa microbiana.....	37
4.4.3. Determinação do óleo residual	37
4.4.4. Análise Estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	38
5.2. Cultivos com óleo de soja.....	39
5.2.A. Variação da concentração da solução de elementos traço no meio contendo óleo de soja.....	39

5.2.B. Avaliação da importância de cada elemento traço para a produção de ramnolipídios a partir de óleo de soja.....	43
5.2.C. Avaliação dos elementos citrato e cobalto na produção de ramnolipídios a partir de óleo de soja.....	47
5.3. Cultivos com glicerina.....	50
5.3.A. Variação da concentração da solução de elementos traço no meio com glicerina P.A.	50
5.3.B. Avaliação da importância de cada elemento traço para a produção de ramnolipídios utilizando glicerina P.A. como fonte de carbono.....	53
5.3.C. Avaliação dos elementos citrato e cobalto na produção de ramnolipídios utilizando glicerina P.A. como fonte de carbono.....	56
6. CONCLUSÕES.....	62
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos sintetizados por microrganismos, que, devido a sua atividade de superfície, possuem diversas aplicações como biorremediação de ambientes poluídos por petróleo, óleo e derivados, recuperação terciária de petróleo, produção de fármacos, detergentes, emulsificantes, lubrificantes, entre outras (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000). Apesar disso, problemas como a utilização de substratos caros, baixo rendimento e alto custo nas etapas de purificação do produto, resultam numa diminuição de suas aplicações industriais. Uma estratégia, na tentativa de driblar estes problemas, seria o uso de fontes renováveis de baixo custo, que resultem em elevada produção destas moléculas, além da utilização de processos de purificação mais econômicos e eficazes (MUKHERJEE; DAS; SEM, 2006).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por sintetizarem ramnolipídios, moléculas anfipáticas promissoras em termos de produção industrial, já que, são obtidos em concentrações superiores a outros biossurfactantes. Além disso, apresentam excelentes propriedades tenso-ativas e características físico-químicas e biológicas que permitem a sua aplicação em diferentes ramos industriais (BENICASA et al., 2002).

Apesar do potencial para a utilização de ramnolipídios, seu uso é limitado, pois sua produção é 3 à 10 vezes mais expensiva que a síntese de surfactantes químicos (MULLIGAN; GIBBS, 1989). O sucesso na comercialização de qualquer bioproduto está envolvido diretamente com seus custos de produção. Este custo pode ser reduzido pela seleção de linhagens eficientes, otimização dos compostos do meio e utilização de substratos alternativos mais baratos (PANESAR; PANESAR; BERA, 2011).

Sendo assim, a proposta deste trabalho foi verificar a concentração, influência, e importância de elementos traço no cultivo de *P. aeruginosa* LBI, para a produção de ramnolipídios.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica; sendo a porção hidrofóbica geralmente composta por uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados; e, uma porção hidrofílica, podendo ser iônica, não-iônica ou anfotérica (DESAI; BANAT, 1997; BOGNOLO, 1999).

Devido a essa característica molecular, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade como interfaces óleo/água ou ar/água, formando um filme ordenado, diminuindo a tensão superficial e interfacial. A eficiência dos surfactantes pode ser medida através da sua capacidade de diminuir a tensão superficial, onde se quantifica a energia livre da superfície, por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (MULLIGAN, 2005).

2.2. Biossurfactantes

Biossurfactantes, por sua vez, são metabólitos sintetizados por diversos micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os surfactantes sintéticos são usualmente classificados de acordo com o grupo polar, entretanto os biossurfactantes são diferenciados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes de biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; BANAT, 1997).

Dentre as espécies de bactérias produtoras de biossurfactantes há a *P. aeruginosa*, que é uma bactéria que pode ser isolada de diferentes habitats, como águas, solos e plantas, mas pode também ser encontrada em humanos como um patógeno oportunista. Esta bactéria é capaz de produzir um biossurfactante da classe dos glicolipídios, chamado de ramnolipídio, que contém uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácidos graxos (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005). Os quatro principais homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* são RL1 e RL2 contendo 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à duas moléculas de ácido β -

hidroxidecanóico, e os homólogos RL3 e RL4, que possuem 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à uma molécula de ácido β -hidroxidecanóico (Fig. 1) (LANG; WAGNER, 1987).

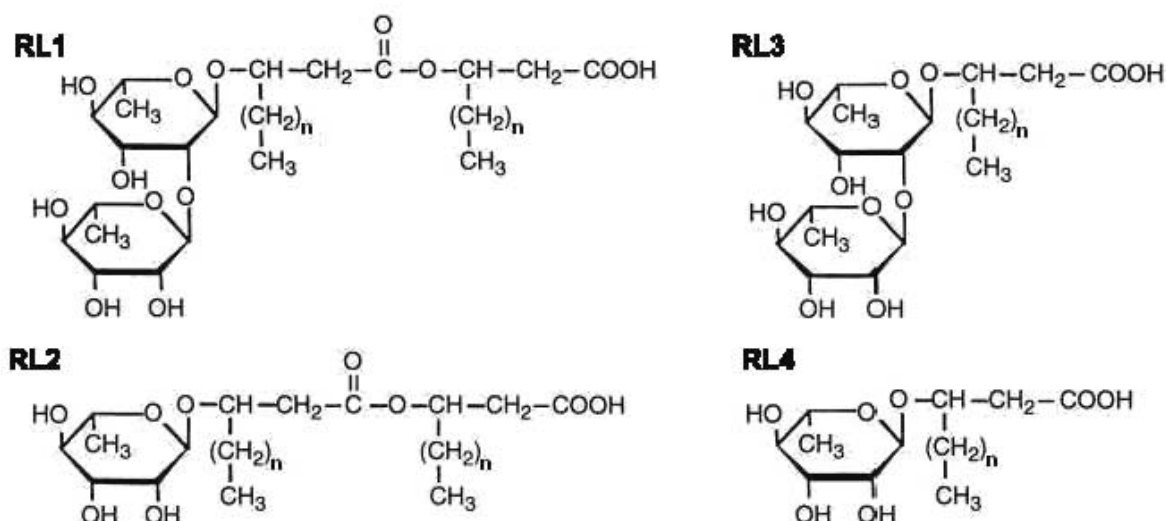


Figura 1: Estruturas dos principais homólogos de ramnolipídios (RL1, RL2, RL3 e RL4), produzidos por *P. aeruginosa*.

Dentre as vantagens dos ramnolipídios, pode-se destacar seu fácil isolamento da cultura, uma vez que se trata de um biossurfactante extracelular (MATA-SANDOVAL; KARNS; TORRENTS, 1999); podem reduzir a tensão superficial da água de 72mN/m para 30mN/m e a tensão interfacial de água/óleo para valores inferiores à 1mN/m, além de serem produzidos em concentração superior aos demais biossurfactantes (BENICASA et al., 2004)

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis e a capacidade de modificação estrutural empregando a engenharia genética ou técnicas bioquímicas (BANAT; MAKAR; CAMEOTRA, 2000; THANOMSUB et al., 2007; LOVAGLIO et al., 2011).

2.3.Histórico dos Ramnolipídios e *P. aeruginosa*

A Figura 2, a seguir, resume os principais eventos e descobertas no campo dos ramnolipídios, desde seu descobrimento em 1947 por Jarvis e Johnson, até os estudos mais recentes voltados à melhoria na produção dos ramnolipídios. (JARVIS; JOHNSON, 1949; CHRZANOWSKI; LAWNICZAK; CZACZYK, 2012).

1940	1950-1960 Relatos da produção de ramnolipídios por <i>P. Aeruginosa</i>	1946-47 - Descoberta dos ramnolipídios
1960	1960-1980 Estudos focados na produção de ramnolipídios e suas estruturas	1965 - Isolamento e identificação de di-ramnolipídios 1971 - Isolamento de mono-ramnolipídios 1976 - Descoberta de ramnolipídios homólogos (A e B)
1980	1980-1990 Estudos concentrados na otimização das condições de produção	1985 - Produção de ramnolipídios em condições limitantes de nitrogênio; descoberta de novos congêneres 1987 - Detecção de ramnolipídios em amostras de escarro humano
1990	1990-2000 Estudos focados na biossíntese de ramnolipídios, sua função nos mecanismos de absorção de hidrocarbonos e seu impacto como fatores de virulência	1994 - Revelada a influência dos ramnolipídios na superfície celular
2000	2000-2012 Estudos focados em outras aplicações dos ramnolipídios, eficientes métodos de produção e utilização de mutantes para melhor compreender sua regulação e produção	2000 - Envolvimento dos ramnolipídios na remoção de lipopolisacarídeos das células de <i>P. aeruginosa</i> 2005 - Efeito na remoção de células de biofilmes bacterianos confirmado 2007 - Envolvimento dos ramnolipídios no controle do sistema de mobilidade e em processos de formação de biofilme confirmado 2008 - Função dos ramnolipídios no sistema regulatório influenciando mudanças no modo de vida bacteriana reportado
2012		

Figura 2: Principais campos de pesquisa, eventos e descobertas no campo dos ramnolipídios. Modificado de Chrzanowski, Lawniczak e Czaczuk (2012).

2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa versátil, não formadora de esporos e móveis, que cresce em solos, pântanos e habitats marinhos costeiros, bem como em plantas e tecidos animais (HARDALO; EDBERG, 1997). Estas bactérias são capazes de metabolizar diversas fontes de carbono, desde pequenas moléculas simples, à compostos orgânicos complexos, incluindo substâncias hidrofóbicas como óleos vegetais e derivados do petróleo, à moléculas hidrofílicas como glicerol e glicose (NITSCHKE et al., 2005). Elas são capazes de crescer tanto aerobicamente, quanto anaerobicamente usando NO_3 ou arginina comoceptor de elétrons, e são capazes de se multiplicarem em diversas temperaturas, porém, sua temperatura de crescimento ótima é de 37°C. (KILL et al., 2008).

P. aeruginosa é capaz de produzir no mínimo quatro pigmentos distintos: (1) piocianina (azul), pigmento encontrado em 80 % das cepas e sua produção é estimulada pela presença de glicerol, magnésio, potássio e ferro; (2) pioverdina (amarelo-esverdeado); (3) piorrubrina (vermelho) e (4) piomelanina (marrom-escuro), estes dois últimos pigmentos são produzidos por menos de 2 % de isolados clínicos (VISCA et al., 1992).

Devido a sua alta resistência a antibióticos, *P. aeruginosa* é considerada uma das três bactérias que mais causam infecções oportunistas em pacientes imunodeficientes (STOVER et al, 2000). Sua ocorrência é grande em vítimas de queimaduras, no trato urinário de pacientes cateterizados, em pessoas com pneumonia, e é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (BODEY et al, 1983; STOVER et al, 2000).

Além de humanos, *P. aeruginosa* também é capaz de infectar plantas, principalmente em sua rizosfera (MATOS; KERKHOF; GARLAND, 2005, ATTILA et al., 2008), porém, esta bactéria em alguns casos poder se utilizada como um agente indutor de resistência a outros micro-organismos patógenos, como o caso do *Botrytis cinerea*, onde *P. aeruginosa* KMPCH aumentou da resistência de pés de tomates (AUDENAERT, 2002) ou *P. aeruginosa* 7NSK2 em pés de feijões (DE MEYER et al., 1999).

Estas bactérias também podem ser utilizadas para a biosorção de metais pesados de ambientes contaminados, como por exemplo, urânio (CHOUDHARY; SAR, 2011), cádmio, cobre (KONG et al., 2009), níquel, chumbo (GABR; HASSAN;

SHOREIT, 2008) e cromo (KANG; LEE; KIM, 2007). Com relação à preservação ecológica, além da biosorção de metais, locais contaminados com petróleo e óleos são biorremediados com o auxílio de cepas de *P. aeruginosa* (DAS; MUKHERJEE, 2007; KARAMALIDIS et al. 2010; THAVASI; JAYALAKSHMI; BANAT, 2011). Este micro-organismo também é capaz de assimilar PAH (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos), poluentes ambientais produzidos por atividades humanas (NIE et al., 2010; HEHM, 2008).

O potencial biotecnológico de *P. aeruginosa* é grande, pois, diversos são os bioprodutos que podem ser obtidos pelo seu cultivo, dentre eles podemos destacar: polihidroxialcanoatos, alginato, pioverdina, piocianina e ramnolipídios (HEHM, 2008). Os polihidroxialcanoatos são endopolímeros que podem ser produzidos por diversos micro-organismos, e dentre eles *P. aeruginosa*; e possuem diversas aplicações, pois apresentam propriedades flexíveis ou elastômeros, tornando-os úteis para aplicações biomédicas e para a fabricação de materiais de embalagem (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011). O alginato é um grupo de exopolissacarídeos utilizado numa ampla variedade de fins industriais, como agente estabilizante, espessante e gelificante, na indústria de alimentos e também para imobilizar células nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; DA SILVA, 2008).

O pigmento pioverdina e a piochelina são considerados sideróforos, e ambos são produzidos por *P. aeruginosa*, e estes compostos atuam na captação de ferro e por isso apresentam um uso potencial como agentes farmacológicos e agroquímicos (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002). A piocianina é outro pigmento produzido por *P. aeruginosa* e esta juntamente com o ácido fenazina-1-carboxílico, são fenazinas que possuem propriedades antimicrobianas (FERNÁNDEZ; PIZARRO, 1997). Já os ramnolipídios, como serão descritos a seguir no item 2.4., possuem diversas aplicações comerciais, e também são um dos metabólitos produzidos por *P. aeruginosa*.

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de *P. aeruginosa* LBI, esta foi inicialmente isolada no Laboratório de Bioquímica Industrial (LBI) do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, SP, a partir de uma amostra de solo contaminado de petróleo (BENINCASA et al., 2002). Desde então, foram realizados diversos trabalhos com esta linhagem para produção de ramnolipídios, primeiramente priorizando sua produção em pequena escala e melhoramento do meio de cultura e das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas. Depois foram

realizados trabalhos em biorreatores e testes das aplicações e propriedades dos ramnolipídios obtidos. Em 2008, a linhagem *P. aeruginosa* foi submetida à mutação randômica, gerando outras linhagens mais promissoras quanto à produção de ramnolipídios (NITSCHKE et al., 2005; COSTA et al., 2006; PIRÔLLO et al., 2008; COSTA; NITSCHKE; CONTIERO, 2008; SILVA et al., 2009; LOVAGLIO et al., 2010; LOVAGLIO et al., 2011; LOVAGLIO, 2011).

2.5. Aplicação comercial dos biossurfactantes

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na extração terciária de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações distribuem-se entre os mais diversos setores industriais (DESAI; BANAT, 1997).

Urum et al. (2006) estudaram a eficiência de diferentes surfactantes na remoção de óleo cru de solos contaminados, empregando o processo de lavagem do solo, uma inovadora proposta na tecnologia de remediação. Tal processo possui menor custo, sendo relativamente mais rápido e seu potencial em recuperar e tratar grandes volumes de contaminantes é maior quando comparado com outras técnicas de biorremediação.

O potencial de aplicação dos biossurfactantes está baseado em suas propriedades funcionais de moléculas anfipáticas como, emulsificação, separação, capacidade molhante, solubilização, de-mulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Assim, podem ser utilizados na agricultura, indústria farmacêutica, formulação de cosméticos, indústria de processamento de alimento, indústria de bebida, de papel, de metal, de produtos de limpeza, de couro e indústria têxtil (FIECHTER, 1992).

Na agricultura os ramnolipídios possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos (ABALOS et al., 2001). Segundo Gustafsson et al (2009), ramnolipídios podem controlar a proliferação de algumas algas, sem causar efeitos danosos ao ecossistema.

Os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* podem ser utilizados como agentes antimicrobianos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Segundo Rodrigues et al. (2006), os ramnolipídios atuam contra *Mycobacterium tuberculosis* e exerce atividade anti-aderente contra diversas bactérias e leveduras isoladas de próteses fonatórias.

Thanomsub et al., (2007), relataram a inibição do crescimento de células cancerosas humanas por homólogos de ramnolipídios, produzidos por *P. aeruginosa* B189. E segundo Piljac et al. (2008) a incorporação de 0,1% de di-ramnolipídios em pomadas aumentou a eficiência do tratamento de úlceras de pacientes decúbitos.

Kumar e Mamidyala (2011) fizeram a síntese de nanopartículas de prata, utilizando o sobrenadante de culturas de *P. aeruginosa*, em um processo que pode ser classificado como “síntese verde”, pois gera menos resíduos, é atóxico e compatível ecologicamente. As nano partículas de ramnolipídios e prata exibiram atividade antimicrobiana contra patógenos Gram positivos/ negativos e leveduras *Candida albicans*, evidenciando o amplo espectro de ação da sua atividade antimicrobiana (GANESH et al., 2010).

Worakitsiri et al (2011) relataram a produção de nano-hastes e nanotubos de polímeros condutivos de polianilina com o auxílio de ramnolipídios. Estes nanotubos são utilizados em baterias recarregáveis, em revestimentos condutores, em sistemas de armazenamento de energia e em dispositivos elétricos ou quimioelétricos.

Ramnolipídios também podem ser utilizados para a remoção tanto de metais pesados como arsênico de rejeitos da mineração (WANG; MULLIGAN, 2009). Outra aplicação é a remoção de cromo (VI) da água e do solo (ARA; MULLIGAN 2008).

Indústrias de cosméticos e de medicamentos utilizam biossurfactantes como agentes emulsificantes e solubilizantes. Repelentes de insetos, pastas dentais, produtos anticaspa e desodorantes são alguns exemplos de produtos que incluem surfactantes em suas fórmulas (MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Ramnolipídios podem ser fontes de L-ramnose estereoespecífica utilizada comercialmente na produção de compostos de sabor, ou como material para a síntese de algumas moléculas orgânicas (LINHARDT et al., 1989)

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tenso-ativos encontram aplicação em panificação e produtos

derivados de carne (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A estabilidade, textura e volume da massa de pães, bem como a conservação destes produtos, podem ser melhorados pela adição de ramnolipídios (VAN HAESENDONCK; VANZEVEREN, 2004).

2.6. Funções fisiológicas

Apesar dos ramnolipídios serem estudados desde a década de 40, suas funções fisiológicas naturais ainda necessitam de maiores estudos, pois em alguns casos tais funções ainda são especulativas, acreditando-se que são moléculas que apresentam múltiplas funções (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005).

Dentre as funções podemos destacar o fato dos ramnolipídios serem moléculas anfipáticas e por isso agirem como agentes que promovem emulsão e redução da tensão superficial. Com isso, os ramnolipídios auxiliam na solubilização de substratos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010). As moléculas de *Pseudomonas Quilone Signal* (PQS), importantes para o sistema de *quorum sensing*, também são solubilizadas pelos ramnolipídios (CALFEE et al., 2005).

Como função ecológica destaca-se que os ramnolipídios possuem propriedades tóxicas contra uma variedade de micro-organismos, estas moléculas apresentam atividade antibacteriana principalmente contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas. E ainda há relatos de que os ramnolipídios exercem atividades antiviral, antifúngica, micoplasmicida, algicida, zoosporicida e anti-amoeba (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005).

Diversas linhagens de *P. aeruginosa* causam infecções graves em pacientes imuno-deficientes e indivíduos que sofrem de fibrose cística. Grande parte dos fatores de virulência tem suas produções controladas pelo sistema de *quorum sensing*, dentre eles estão os ramnolipídios. Os aspectos negativos dos ramnolipídios estão relacionados à sua ação hemolítica e à ação direta em células do sistema imune, que são consequências das suas propriedades detergentes (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005; ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

Estudos comprovam que bactérias da espécie *P. aeruginosa* são capazes de se locomoverem de três diferentes maneiras, nadando, com o auxílio de flagelos;

através de contrações, com o auxílio da pili Tipo IV; e deslocamento. A movimentação por deslocamento ocorre por um movimento organizado da superfície celular, que depende da elongação, presença de determinadas estruturas de adesão (*tendrils*) e contato célula-célula. Os ramnolipídios ainda são capazes de auxiliar neste tipo de movimentação, pois, a produção dos *tendrils* é estimulada pelos di-ramnolipídios, enquanto os mono-ramnolipídios agem como agentes umidificantes (CHRZANOWSKI, LAWNICZAK E CZACZYK, 2012).

A formação dos biofilmes também é auxiliada pelos ramnolipídios, pois estes auxiliam a aderência primária das células, pelos seus efeitos na superfície celular, causados pela liberação de lipopolissacarídeos, aumentando a hidrofobicidade celular (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

2.7. Estratégias de produção de biossurfactantes

As estratégias de produção de biossurfactante variam conforme a natureza dos mesmos, do microrganismo produtor, da fonte de carbono e possíveis limitações nutricionais, além de parâmetros físicos como aeração, agitação, temperatura e pH (CHANG et al., 2005). Esta produção pode ocorrer de diversas maneiras como: associada ao crescimento microbiano, cultivadas em condições limitantes de crescimento celular, produção por células na fase estacionária de crescimento (cultivo sem fonte de nitrogênio) ou pela adição de precursores como compostos lipofílicos e diferentes fontes de carbono (DESAI; DESAI, 1993).

2.8. Biossíntese de ramnolipídios

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

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

Há ainda a possibilidade da síntese das porções hidrofílicas e hidrofóbicas ocorrerem via síntese *de novo*, o que é comum ocorrer durante a produção dos ramnolipídios.

A Figura 3 esquematiza uma proposta das rotas metabólicas envolvidas na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*, empregando óleo de soja ou glicerina como fonte de carbono. A glicerina através da ação da enzima glicerol quinase, será transformada em glicerol-3-fosfato, este por sua vez, ao sofrer a ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase, será convertido em dihidroxiacetona fosfato, em seguida, uma triose fosfato isomerase o transformará em gliceraldeído-3-fosfato (NELSON; COX, 2006)., e este fará parte das vias glicolíticas, sendo que uma porção se tornará acetil-CoA, pela glicólise, e a outra pela gliconeogênese se transformará em D-glicose-6-P, molécula necessária para a formação de dTDP-L-ramnose.

A D-glicose-6-P formada pela gliconeogênese pela ação da AlgC será convertida em D-glicose-1-P, e esta por sua vez é usada por RmlA, RmlB, RmlC e RmlD para produzir dTDP-L-ramnose, a molécula precursora da porção hidrofílica dos ramnolipídios (OLVERA et al., 1999).

O óleo de soja será convertido em acetil-CoA, e uma porção destas moléculas entrará no ciclo do glioxilato e depois no ciclo do ácido cítrico, onde o oxaloacetato gerado se transformará em fosfoenolpiruvato, e este fará parte da gliconeogênese para a produção de D-glicose-6-P, que será convertida em dTDP-L-ramnose como explicado acima.

As moléculas de acetil-CoA geradas tanto pela glicólise da glicerina, quanto pela β -oxidação dos ácidos graxos, serão utilizadas para a produção da porção hidrofóbica das moléculas de ramnolipídios, através da clássica rota de síntese de ácidos graxos (FASII). Um grupamento acila saturado, produzido em cada série de reações em quatro etapas, torna-se o substrato da condensação subsequente com um grupo malonila ativado. Em cada uma das passagens do ciclo, a cadeia do grupo acila graxo aumenta em dois carbonos. A biossíntese de ácidos graxos é dividida em duas etapas, iniciação e alongamento (NELSON; COX, 2006).

A iniciação requer malonil-CoA e malonil-ACP, estas moléculas são obtidas a partir de acetil-CoA que são transformadas pela ação da acetil-CoA carboxilase em malonil-CoA, e este juntamente com uma molécula de proteína carreadora de acila (Acil Carrier protein - ACP), são transformados através da enzima malonil-CoA-ACP transacilase (FabD) em malonil-ACP.

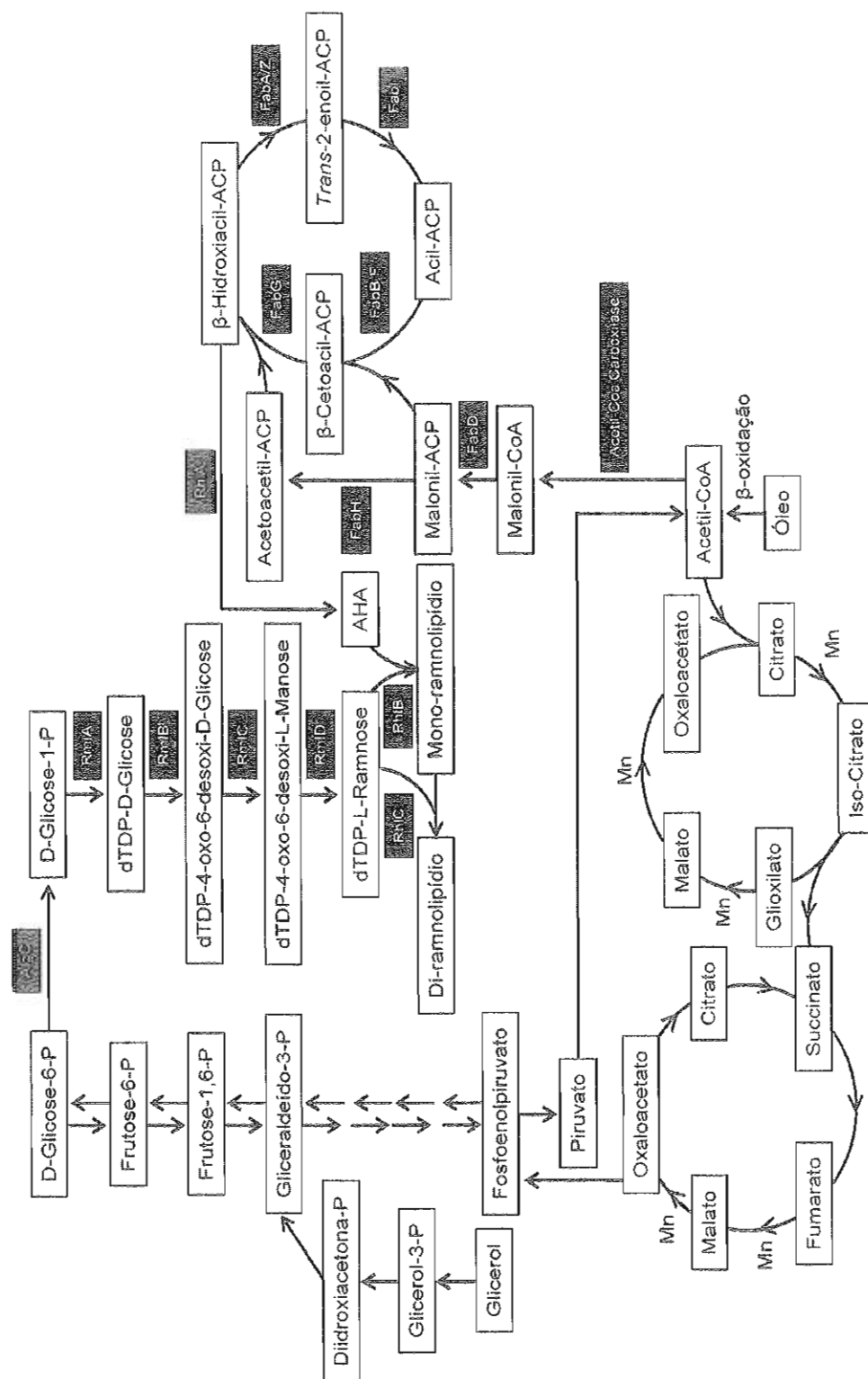


Figura 3: Proposta das rotas metabólicas envolvidas na produção de ramnolípido pela *P. aeruginosa*, tendo óleo de soja ou glicerina como fonte de carbono. Modificado de Abdel-Mawgoud et al. (2011).

O primeiro ciclo de alongamento é iniciado pela FabH, que condensa malonil-ACP e acetil-CoA, os ciclos subsequentes são iniciados pela condensação de malonil-ACP e acil-ACP catalisada pela enzima FabB (ácidos graxos saturados) ou FabF (ácidos graxos insaturados). No segundo passo, o β -cetoacil-ACP anteriormente formado é reduzido pela FabG à β -hidroxiacil-ACP. Na terceira etapa, este é então desidratado pela FabA ou FabZ formando *trans*-2-enoil-ACP, que por sua vez, é reduzido à acil-ACP pela FabI, no estágio final (HOANG; SCHWEIZER, 1997).

A ligação entre os intermediários do FASII e a síntese de ramnolipídios, ainda é um ponto que necessita de mais estudos, a Figura 3 apresenta umas das hipóteses existentes, onde a enzima RhlA transforma as moléculas de β -hidroxiacil-ACP, nos ácidos 3-hidroxiálcânóicos (AHA), que são os precursores lipídicos dos ramnolipídios e substrato da ramnosiltransferase 1 (RhlB) (ZHU; ROCK, 2008).

Por fim, a síntese dos ramnolipídios ocorre pela ação da enzima ligada a membrana RhlB, que utiliza uma molécula de AHA e outra de dTDP-L-ramnose para a formação dos mono-ramnolipídios, e este pode ser substrato, juntamente com outra molécula de dTDP-L-ramnose, para a enzima RhlC formar os di-ramnolipídios (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005).

2.9. Regulação gênica da produção dos ramnolipídios

As três principais enzimas envolvidas na síntese dos ramnolipídios (RhlA, RhlB e RhlC), são codificados por um conjunto de genes chamados *rhl*, e estes são regulados por um sistema chamado de *quorum sensing*, que é caracterizado pela secreção e detecção de sinais moleculares, também conhecidos por autoindutores, caracterizando uma comunicação célula-célula (REIS et al., 2011).

Em muitas bactérias, incluindo *P. aeruginosa*, a produção de fatores de virulência e metabólitos secundários é regulada em conjunto com a densidade celular através do *quorum sensing* (LATIFI et al., 1996).

A Figura 4 demonstra parte do sistema *quorum sensing* presente em *P. aeruginosa*, responsável pela produção dos ramnolipídios.

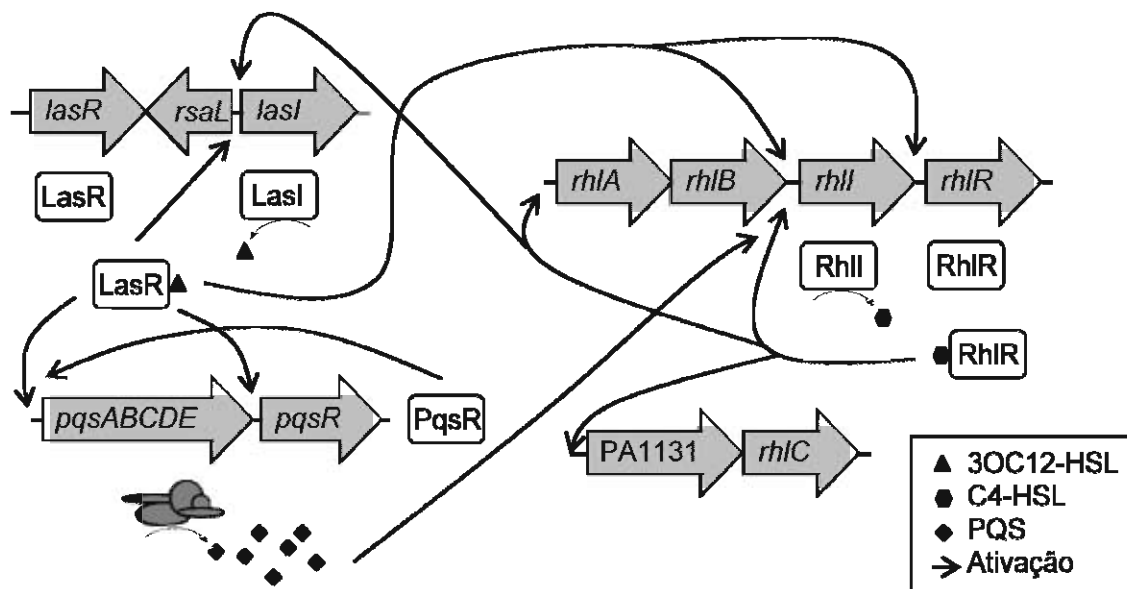


Figura 4: Parte da regulação gênica envolvida na biossíntese dos ramnolipídios por *P. aeruginosa*. Modificado de Abdel-Mawgoud et al., (2011) e Reis et al., (2011).

Os três principais sistemas gênicos de *P. aeruginosa*, regulados por *quorum sensing*, e responsáveis pela produção de ramnolipídios são o *las*, *rhl* e *pqs* (REIS et al., 2011). O sistema *las* tem como regulador transcricional o LasR, que é expressado pelo gene *lasR*. Este regulador se liga ao seu autoindutor *N*-(3-oxodecanoil)-*L*-homoserina lactona (3OC12-HSL), que é formado após uma alta densidade celular (VESELOVA, 2010).

O complexo LasR e seu autoindutor ativa a transcrição do gene *lasI* e este, por sua vez, expressa a proteína LasI, que promove a produção de mais 3OC12-HSL. Este complexo também ativa a transcrição dos genes *pqsABCDE* e *pqsR*. Depois de ativado, o *pqsR* produz o regulador transcricional PqsR, que, por sua vez, juntamente com o complexo LasR, ativam o conjunto gênico *pqsABCDE*, que é responsável pela produção do *Pseudomonas quinolone signal* (PQS), ou 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (REIS et al., 2011).

O PQS, juntamente com o complexo LasR, ativam os genes *rhlRI*, do sistema *rhl*. O gene *rhlR* é responsável pela produção do regulador transcricional RhIR, que se uni ao autoindutor *N*-butanol-*L*-homoserina lactona (C4-HSL), este autoindutor é produzido pela sintase RhII, codificada pelo gene *rhlI* (WILLIAMS; CÁMARA, 2009).

O complexo RhIR e C4-HSI ativa os genes *rhIAB* e *rhIC*, responsáveis pela codificação das enzimas RhIA, RhIB e RhIC. Este complexo também exerce função ativadora no gene *lasI*, e inibitória no *pqsR* (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011).

2.10. Fontes alternativas de carbono na produção de biossurfactantes.

O uso de substratos não-convencionais, de baixo custo, é uma estratégia importante para a redução dos custos de produção e consequente ampliação da produção industrial destes biotensoativos.

Ramnolipídios podem ser produzidos a partir de fontes de carbono variadas: substratos hidrofóbicos como óleos vegetais e resíduos do refino destes estão entre as fontes alternativas mais utilizadas, enquanto que substratos hidrofílicos, como glicose, são menos explorados (NITSCHKE et al., 2005).

Nitschke et al. (2005) testaram diferentes resíduos de óleos vegetais (soja, algodão, milho, palma e babaçu), verificando a potencialidade destes como substrato na produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Lovaglio et al (2010) utilizaram borra de soja como fonte de carbono e obtiveram uma produção de ramnolipídios de 16,9 g/L por esta mesma linhagem.

Estudos recentes têm demonstrado que óleos vegetais utilizados em fritura de alimentos se apresentam como mais uma fonte de carbono para a produção de ramnolipídios (HABA et al., 2000; ABALOS et al., 2001; BENINCASA et al., 2002; NITSCHKE et al., 2005; RAZA et al., 2006). No Brasil, há uma grande produção e consumo destes óleos, principalmente óleo de soja, gerando muitos resíduos, que podem ser tratados através de biotransformação.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* também é capaz de sintetizar ramnolipídios utilizando glicerol (NITSCHKE et al., 2005; SOUZA et al., 2011) embora em pequena quantidade, quando comparado à quantidade produzida a partir de substratos hidrofóbicos. Sendo o glicerol um dos principais subprodutos gerados na produção de biodiesel, e, com a grande demanda deste combustível devido à implantação da Lei Federal 11.097/2005, o destino do glicerol é mais um problema a ser resolvido, e sua utilização para a produção de biomoléculas de alto valor agregado como ramnolipídios e polihidroxialcanoatos seria uma alternativa de utilização deste resíduo.

2.11. Influência de elementos traços na produção de ramnolipídios.

Segundo Soberon-Chavez (2010), além da limitação de fósforo e de nitrogênio, a disponibilidade restrita de íons multivalentes como Mn, Ca, K, Na e soluções de elementos traços também favorecem a produção de ramnolipídios. Os elementos traços ou micronutrientes correspondem aos metais, e embora sejam necessários em baixas concentrações, os micronutrientes são essenciais às funções celulares, assim como os macronutrientes, pois muitos deles desempenham papel estrutural em várias enzimas, como pode ser visualizado na Tabela 1 (MADIGAN et al. 2010)

Tabela 1: Micronutrientes (elementos traços) necessários aos micro-organismos

Elemento	Função celular
Cromo (Cr)	Requerido por mamíferos no metabolismo da glicose; microrganismos não o necessitam.
Boro (B)	Presente em um autoindutor de <i>quorum sensing</i> em bactérias; também encontrado em alguns antibióticos policetídeos
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcaboxilase (bactérias que metabolizam ácido propiônico)
Cobre (Cu)	Respiração; citocromo c oxidase; fotossíntese; plastocianina e algumas superóxido dismutases.
Manganês (Mn)	Ativador de muitas enzimas; presente em certas superóxido dismutases e na enzima que cliva a água em fototróficos oxigênicos (Fotossistema II).
Molibdênio (Mo)	Certas enzimas contendo flavinas; nitrogenase; nitrato redutase; sulfito oxidase; DMSO-TMAO redutases e algumas formato desidrogenases.
Níquel (Ni)	Maioria das hidrogenases; coenzima F ₄₃₀ de metanogênicos; monóxido de carbono desidrogenase; urease.
Selênio (Se)	Formato desidrogenase; algumas hidrogenases; no aminoácido selenocisteína.
Tungstênio (W)	Algumas formatos desidrogenases; oxotranferases de hipertermófilos.
Vanádio (V)	Vanádio nitrogenase; bromoperoxidase.
Zinco (Zn)	Anidrase carbônica; álcool desidrogenase; RNA e DNA polimerase e muitas proteínas de ligação ao DNA.
Ferro (Fe) ^b	Citocromos; catalases; peroxidases; proteínas contendo ferro e enxofre; oxigenase; todas as nitrogenases.

^a Nem todos os micronutrientes listados são requeridos por todas as células; alguns dos metais listados são encontrados em enzimas de apenas alguns microrganismos específicos.

^b Necessário em maiores quantidades que os outros metais traço

Modificado de Madigan et al. (2010)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

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

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o volume necessário de solução de elementos traço do Sais de Robert para a maior produção de ramnolipídios,
- Avaliar a influência dos micronutrientes presentes no meio Sais de Robert: boro, cobre, manganês, molibdênio e zinco na produção de ramnolipídios,
- Inferir a influência de outros elementos, como citrato e cobalto, na produção de ramnolipídios.
- Contribuir para a otimização do meio de cultura utilizado para a produção desse bioproduto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI, isolada de solo contaminado com petróleo (BENICASA et al. 2002).

4.2. Meio de cultura e condições de cultivo

4.2.A. Meio de cultura para o pré-cultivo

Para o pré-cultivo do micro-organismo foi utilizado o caldo nutriente, composto por (g/L): peptona 5,0 e extrato de carne 3,0.

4.2.B. Meio de cultura para produção dos ramnolipídios

O meio de cultura utilizado para a produção de ramnolipídios foi o meio salino descrito por Robert et al. (1989), composto por (g/L): NaNO_3 , 4,0; extrato de levedura, 0,1; sais de Robert, 20mL/L contendo: K_2HPO_4 , 1,0; KH_2PO_4 , 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; KCl , 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; CaCl_2 , 0,01; e solução de elementos-traço padrão contendo H_3BO_3 (0,026%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,05%), $\text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,006%) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,07%).

4.2.C. Fontes de carbono

Foram utilizadas duas fontes de carbono, óleo de soja refinado comercialmente vendido (Liza tipo 1) e glicerina P.A. (Pro Analyse) da marca Synth, com 2 ppm de metais pesados e 0,001% de sulfatos. As fontes de carbono foram adicionadas ao meio na concentração de 2% (m/v).

4.2.D. Preparo do pré-inóculo e condições de cultivo

Primeiramente os micro-organismos foram pré-cultivados em frascos (125 mL) contendo 50 mL de caldo nutriente e 100 μL da cultura estoque da linhagem a ser avaliada. A incubação foi feita em mesa agitadora, durante 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida transferiu-se 5,0 mL do pré-cultivo para frascos de 500 mL com 200 mL de Sais de Robert e 2 % (m/v) de óleo de soja ou glicerina P.A., incubou-se por 24 horas à 37°C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação

do meio de produção, resultando em uma DO_{580nm} (Espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC) inicial da fermentação de 0,1 nos frascos de fermentação.

O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8 com HCl 1M e NaOH 1M. Todo o material utilizado nos ensaios fermentativos foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura e incubados em mesa agitadora a 37°C, 200 rpm, por 96 horas.

A primeira etapa do projeto foi verificar a produção de ramnolipídios, com ambas as fontes de carbono descritas anteriormente, em diferentes concentrações da solução de elementos traço no meio (50, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 e 3.000 $\mu\text{L/L}$).

Tabela 2: Concentrações dos íons no meio, nas diferentes concentrações da solução traço adicionadas ao meio de cultivo.

Concentração da solução traço ($\mu\text{L/L}$)	Concentrações dos íons no meio ($\times 10^{-6}$ g/L)				
	BO_3^{3-}	Cu^{2+}	Mn^{2+}	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$	Zn^{2+}
50	12,36	6,36	8,12	2,56	7,95
500	123,6	63,6	81,2	25,6	79,5
1.000	247,2	127,2	162,4	51,2	159,0
1.500	370,8	190,8	243,6	76,8	238,5
2.000	494,4	254,4	324,8	102,4	318,0
2.500	618,0	318,0	406,0	128,0	397,5
3.000	741,6	381,6	487,2	153,6	477,0

Após o ajuste do melhor volume da solução de elementos traços, foram realizados experimentos nas condições descritas na Tabela 3, com ambas as fontes de carbono, com o intuito de se inferir a importância de cada elemento traço na produção de ramnolipídios.

Tabela 3: Concentrações dos íons traço nos meio nas diferentes condições de cultivo estabelecidas para a avaliação da influência dos elementos traços na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI.

Condições	Concentrações dos íons no meio ($\times 10^{-6}$ g/L)				
	BO_3^{3-}	Cu^{2+}	Mn^{2+}	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$	Zn^{2+}
B (-)	0,0	6,36	8,12	2,56	7,95
Cu (-)	12,36	0,0	8,12	2,56	7,95
Mn (-)	12,36	6,36	0,0	2,56	7,95
Mo (-)	12,36	6,36	8,12	0,0	7,95
Zn (-)	12,36	6,36	8,12	2,56	0,0
Controle	12,36	6,36	8,12	2,56	7,95

B (-): Ausência de boro; Cu (-): Ausência de cobre; Mn (-): Ausência de manganês; Mo (-): Ausência de molibdênio e Zn (-): Ausência de zinco.

Também foi avaliada a produção de ramnolipídios com o acréscimo de outros elementos, como o citrato e cobalto, para tal, foram utilizados os respectivos sais citrato de sódio dihidratado e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Tais experimentos seguiram as condições expostas pela Tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Concentrações dos íons traço nos meio nas diferentes condições de cultivo estabelecidas para a avaliação da influência do citrato e cobalto na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI.

Condições	Concentrações dos íons no meio ($\times 10^{-6}$ g/L) ($\times 10^{-3}$ g/L)*						
	BO_3^{3-}	$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3^{3-*}$	Co^{2+*}	Cu^{2+}	Mn^{2+}	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$	Zn^{2+}
Cit (+)	12,36	1,28	0,0	6,36	8,12	2,56	7,95
Co (+)	12,36	0,0	0,29	6,36	8,12	2,56	7,95
CitCo (+)	12,36	1,28	0,29	6,36	8,12	2,56	7,95
Controle	12,36	0,0	0,0	6,36	8,12	2,56	7,95

Cit (+): Adição de citrato; Co (+): Adição de cobalto; CitCo (+): Adição de citrato e cobalto

4.3. Processamento das amostras

O volume de retirada de cada amostra foi de 10 mL, sendo a amostragem realizada a cada 24 horas de cultivo. As amostras cultivadas em glicerina P.A. foram centrifugadas à 4.000 rpm por 30 min e 4°C, com o intuito de separar as células da

fase aquosa. Nos ensaios contendo óleo de soja como fonte de carbono houve a retirada do óleo residual através da mistura de n-hexano às amostras (1:1), seguida de agitação vigorosa por 1 minuto. A mistura foi centrifugada à 4.000 rpm, 4°C e 30 min para a separação de 3 fases: n-hexano (contendo óleo residual), fase aquosa e fase contendo as células.

Na purificação dos ramnolipídios a fase aquosa obtida na etapa anterior foi agitada vigorosamente por 1 minuto com acetato de etila (1:1,25), a mistura foi centrifugada à 6.000 rpm, 4°C e 20 min. A porção superior foi reservada, para posterior evaporação do solvente e o procedimento de purificação foi repetido com a porção inferior.

4.4. Métodos Analíticos

4.4.1. Avaliação da produção de Ramnolipídios

4.4.1.A. Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada 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 uma solução de 2 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico. As amostras consistiram em 10 µL de extratos de ramnolipídios obtidos, a partir do acetato de etila, em diferentes tempos de fermentação, além dos padrões de ramnolipídios obtidos pela Jeneil Biosurfactant Company, USA.

4.4.1.B. Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC

4.4.1.B.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, Schuphan e Schmidt (1995), com pequenas modificações. As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360 µL de acetonitrila e 40 µL da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40mM e Trietilamina 20mM, ambos em acetonitrila. As amostras foram

mantidas em um banho seco com agitação de 1400 rpm, à 60°C, por um período de 1,5 horas.

4.4.1.B.2. HPLC

As análises foram realizadas com um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV. Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio nas seguintes concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g/L. Para as análises foi utilizada 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 sol. B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida ocorre 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 de $21,5 \pm 0,1$ min para Rha-Rha-C10C10 e $22,2 \pm 0,1$ min para Rha-C10C10]. Os padrões de Rha-Rha-C10C10 e Rha-C10C10 foram provenientes do Laboratório de Biologia Técnica da Universidade de Karlsruhe.

4.4.2. Determinação da biomassa microbiana

Após a separação das células por centrifugação à 6.000 rpm, 4°C e 30 min, o pellet de células foi ressuspenso em NaCl 0,85% (m/v) (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 6.000 rpm, 4°C e 30 min. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantidos em estufa à 100°C até atingir peso constante.

4.4.3. Determinação do óleo residual

A fase de n-hexano foi usada para determinação gravimétrica das concentrações de óleo, após evaporação de alíquotas de 2 mL do solvente.

4.4.4. Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa OriginPro 8, e foram realizados o teste de Anova-One-Way, com o intuito de verificar se havia diferença significativa entre as médias, e o Teste de Tukey foi aplicado para detectar quais tratamentos diferiram entre si. Ambos os testes foram realizados com $p = 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As placas de CCD foram utilizadas como um método rápido para avaliar se os ensaios continham ramnolipídios. Este método auxilia a estipulação de um volume necessário da amostra de acetato de etila + ramnolipídios, para dar sequência às análises no HPLC, sem que os picos do cromatograma excedessem a faixa máxima de detecção, pois, a intensidade dos spots de ramnolipídios presentes nas placas varia conforme sua concentração no acetato de etila, como se pode visualizar na Figura 5.

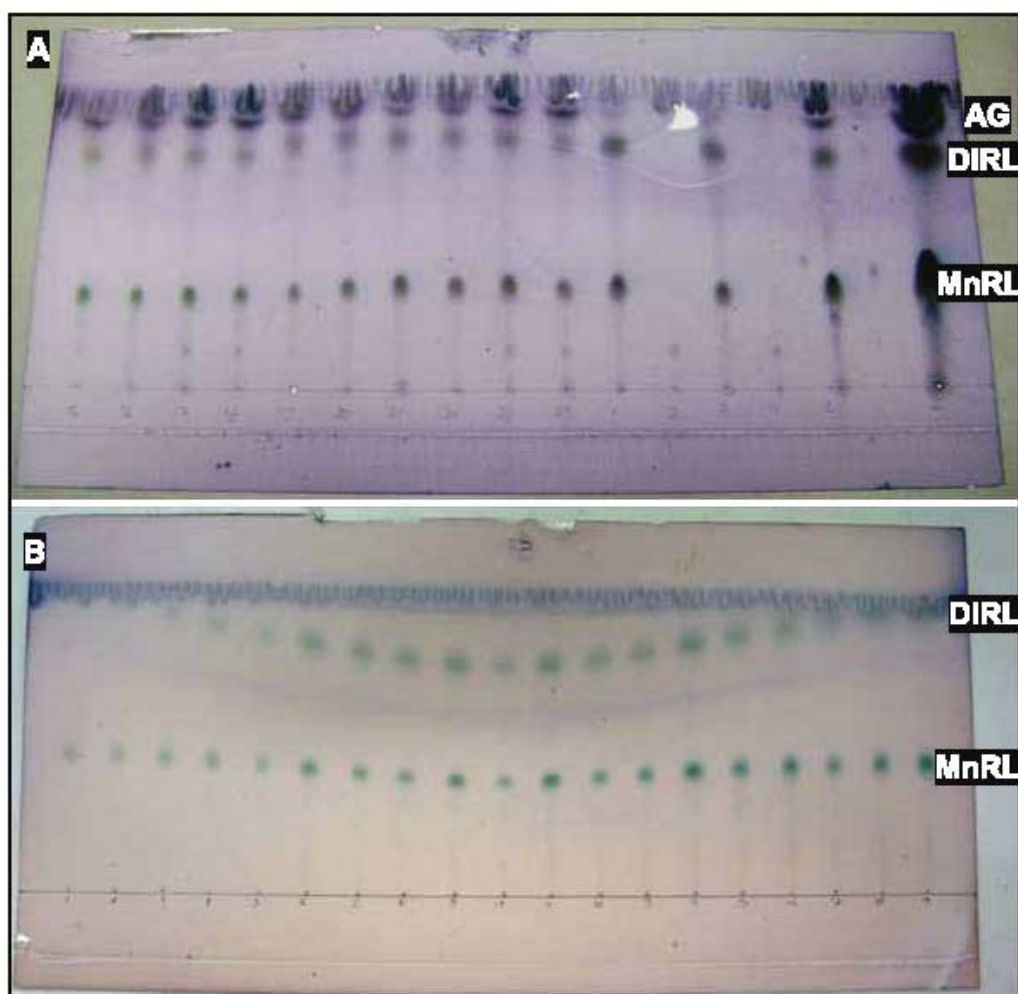


Figura 5: CCD para verificação da produção de ramnolipídios nos cultivos com óleo (A) e glicerina (B). Ácidos Graxos (AG), Di-ramnolipídios (DiRL) e Mono-ramnolipídios (MnRL).

5.2. Cultivos com óleo de soja

A seguir serão expostos os resultados referentes aos cultivos contendo óleo de soja como única fonte de carbono. No item 5.2.A. são demonstrados os dados obtidos na execução da primeira etapa do trabalho, onde foi avaliado a produção de ramnolipídios em diferentes concentrações da solução de elementos traço adicionadas ao meio. A influência individual de cada elemento traço estudado será apresentada no item 5.2.B. E a etapa final do trabalho, com a adição de novos elementos ao cultivo, citrato e cobalto, será apresentada no item 5.2.C. As produções de ramnolipídios, biomassa, e consumo de óleo estão representados em gráficos e a estatística aplicada nas médias do tempo final (96 horas) em tabelas.

5.2. A. Variação da concentração da solução de elementos traço no meio contendo óleo de soja

Como podemos visualizar na Figura 6, em todos os cultivos para avaliar concentração de solução traço, a linhagem de *P. aeruginosa* LBI foi capaz de assimilar a fonte de carbono e se replicar, uma vez que, houve uma grande diferença entre os ensaios não inoculados e após 96 horas de fermentação, pois antes na inoculação o meio se encontrava translúcido e bifásico, já no final da fermentação, o meio apresentou coloração leitosa. Porém, não foi possível observar diferenças visuais entre os ensaios com diferentes volumes adicionados, pois todos apresentaram uma coloração muito semelhante entre si.

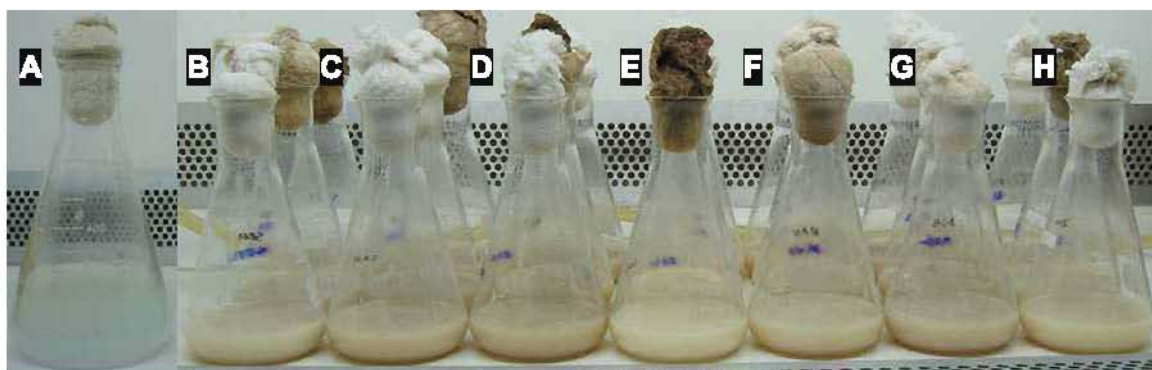


Figura 6: Cultivo de *P. aeruginosa* LBI utilizando óleo de soja como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, em diferentes concentrações ($\mu\text{L/L}$) de solução de elementos traço no meio, 50 (B), 500 (C), 1.000(D), 1.500(E), 2.000 (F), 2.500(G) e 3.000 (H)

Não foi possível obter uma relação direta entre a concentração de solução traço adicionada ao meio e a produção de ramnolipídios. Porém pode-se dividir os resultados em três grupos quanto ao perfil da produção. O cultivo com 50 $\mu\text{L/L}$ foi o único que apresentou produção de ramnolipídios crescente no decorrer da fermentação (Figura 7).

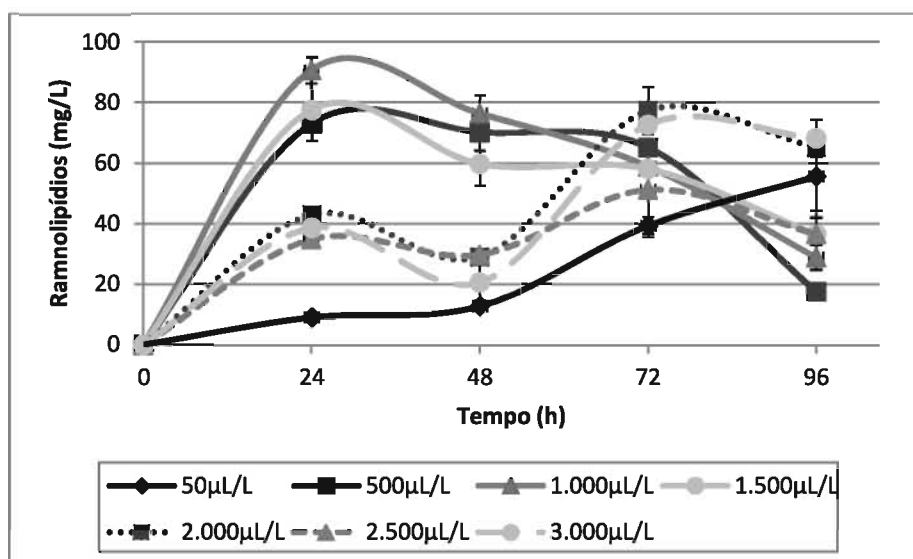


Figura 7: Produção de ramnolipídios (mg/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.

Os cultivos com adição de solução de elementos traços com volumes de 500, 1.000 e 1.500 $\mu\text{L/L}$, apresentaram um perfil de produção semelhante, alcançando o pico de produção no tempo de 24 horas de fermentação, sendo obtidas as seguintes concentrações de ramnolipídios $73,19 \pm 2,47$ mg/L (500 $\mu\text{L/L}$), $90,66 \pm 4,36$ mg/L (1.000 $\mu\text{L/L}$) e $77,57 \pm 10,14$ mg/L (1.500 $\mu\text{L/L}$), em seguida houve declínio destes valores até o final da fermentação (Figura 7).

Os cultivos com os maiores volumes da solução traço adicionados, 2.000, 2.500 e 3.000 $\mu\text{L/L}$, exibiram uma queda na produção em 48 horas, em seguida, alcançaram sua maior produção de ramnolipídios, com os respectivos valores de $77,33 \pm 7,89$, $51,26 \pm 15,79$ e $72,65 \pm 2,42$ mg/L, seguidos de declínio na produção no final da fermentação (Figura 7).

As três maiores produções de ramnolipídios, no tempo de 96 horas, foram encontradas nas concentrações da solução de elementos-traço de 3.000, 2.000 e 50

$\mu\text{L/L}$, com os respectivos valores $68,24 \pm 6,17$, $65,24 \pm 0,00$ e $55,63 \pm 13,60$ mg/L (Figura 7).

Apesar das maiores concentrações de ramnolipídios não ocorrerem sempre, no tempo final da fermentação, optou-se por realizar os testes estatísticos com as médias obtidas no tempo de 96 horas, pois assim seria possível padronizar os testes. Além disso, se analisarmos os ensaios com apenas 24 horas de cultivo ou em outro tempo, que não o final, os dados do perfil de produção de ramnolipídios nas diferentes concentrações, não seriam analisados como um todo.

As três maiores produções de ramnolipídios em 96 horas de cultivo (3.000, 2.000 e 50 $\mu\text{L/L}$) não diferiram estatisticamente (Tabela 5). Dessa maneira nos próximos experimentos com óleo de soja como fonte de carbono, foi utilizada a concentração de 50 $\mu\text{L/L}$ como controle para os posteriores estudos com óleo de soja como fonte de carbono, pois o volume menor de solução representa menor gasto para a composição do meio.

Tabela 5: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em óleo de soja e diferentes volumes de solução de elementos traço.

Condição ($\mu\text{L/L}$)	Média (mg/L)	Probabilidade*
50	$55,63 \pm 13,60$	-----
500	$17,69 \pm 0,87$	0,03041
1.000	$28,96 \pm 4,12$	0,14174
1.500	$36,53 \pm 7,75$	0,99795
2.000	$65,24 \pm 0,00$	0,90569
2.500	$36,66 \pm 1,91$	0,39622
3.000	$68,24 \pm 6,17$	0,75892

*os valores em negrito apresentaram diferença estatística

A maior concentração de biomassa do cultivo com 50 $\mu\text{L/L}$ foi alcançada no tempo de 48 horas, com $1,52 \pm 0,47\text{g/L}$, seguido de declínio na densidade celular até o final da fermentação. Os demais ensaios alcançaram seus maiores valores de biomassa no tempo de 72 horas, $1,82 \pm 0,08$ g/L em 500 $\mu\text{L/L}$, $1,91 \pm 0,13$ g/L com 1.000 $\mu\text{L/L}$ e $2,05 \pm 0,06$ g/L com 1.500 $\mu\text{L/L}$, sendo que em 96 horas houve uma diminuição da biomassa (Figura 8).

Nos ensaios onde se adicionaram as três maiores concentrações da solução traço, houve uma queda da produção de biomassa no tempo de 72 horas, e logo em seguida, alcançando a máxima concentração no tempo final da fermentação, $2,30 \pm 0,16$ (2.000 $\mu\text{L/L}$), $3,11 \pm 0,21$ (2.500 $\mu\text{L/L}$) e $1,85 \pm 0,03$ g/L (3.000 $\mu\text{L/L}$) (Figura 8).

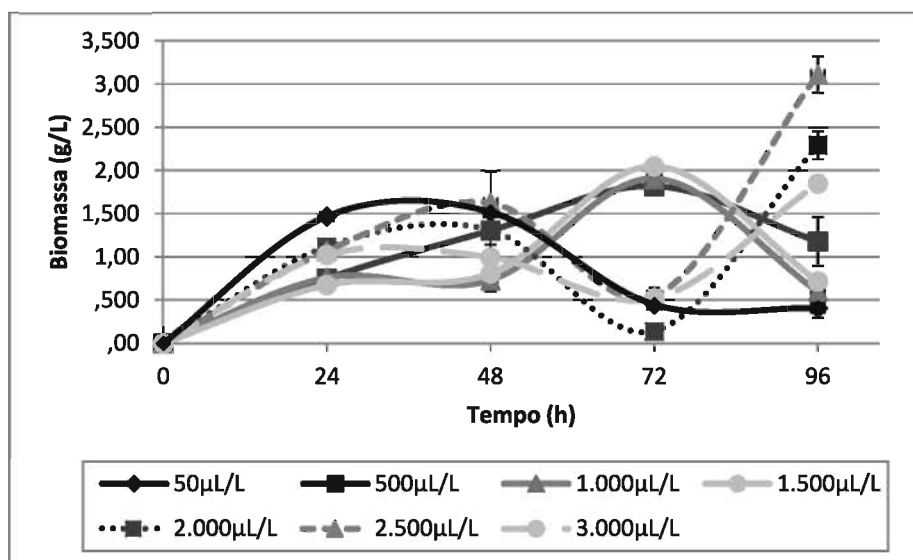


Figura 8: Biomassa (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.

Os cultivos onde se adicionou 50 e 3.000 $\mu\text{L/L}$ de solução traço, apresentaram os menores valores de óleo residual no meio após 24 horas, $4,55 \pm 2,55$ e $5,10 \pm 3,25$ g/L, e ao final da fermentação estes valores aumentaram para $6,18 \pm 2,37$ e $12,85 \pm 1,13$ g/L, respectivamente. Nos demais ensaios houve maior consumo de óleo no tempo de 96 horas, atingindo as seguintes concentrações de óleo $7,70 \pm 1,13$ g/L (500 $\mu\text{L/L}$), $4,28 \pm 1,59$ g/L (1.000 $\mu\text{L/L}$), $3,60 \pm 0,07$ g/L (1.500 $\mu\text{L/L}$), $14,13 \pm 0,6$ g/L (2.000 $\mu\text{L/L}$) e $9,93 \pm 3,22$ g/L (2.500 $\mu\text{L/L}$) de óleo no meio de cultivo (Figura 9).

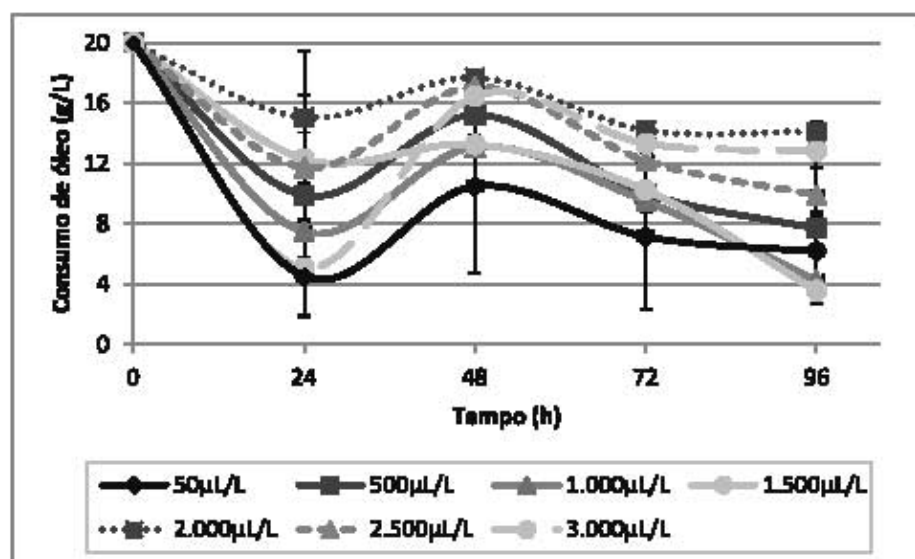


Figura 9: Consumo de óleo (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.

5.1.B. Avaliação da Importância de cada elemento traço para a produção de ramnolipídios a partir de óleo de soja

A Figura 10 ilustra os cultivos antes da inoculação e após 96 horas de cultivo com a ausência de cada um dos elementos traço. A imagem demonstra que apesar da falta de nutrientes, ocorreu crescimento celular e metabolização da fonte de carbono, pois diferente do frasco não inoculado, onde o meio encontra-se translúcido, ao final da fermentação os ensaios apresentaram coloração bege, muito semelhante entre os diferentes cultivos.

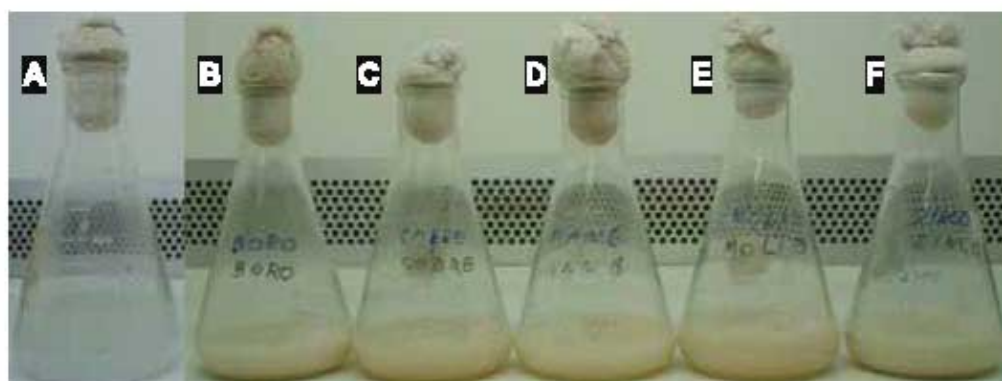


Figura 10: Cultivo de *P. aeruginosa* LBI utilizando óleo de soja como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com ausência de cada um dos elementos traços, boro (B), cobre (C), manganês (D), molibdênio (E) e zinco (F).

A maior concentração de ramnolipídio no cultivo B (-) foi alcançada no tempo de 24 horas, $25,14 \pm 2,21$ mg/L, e ao final da fermentação esta concentração diminuiu para $11,13 \pm 1,56$ mg/L. O mesmo perfil de produção foi encontrado nos ensaios sem cobre e sem zinco, sendo suas concentrações de ramnolipídios em 24 horas de $29,43 \pm 1,33$ mg/L – Cu (-) e $21,85 \pm 1,42$ mg/L – Zn (-). O ensaio Mo (-) atingiu a maior produção de ramnolipídios no tempo de 96 horas com $22,53 \pm 0,67$ mg/L de produto. A concentração do biossurfactante no final da fermentação Mn(-) foi a que mais se aproximou do grupo controle, sendo esta de $55,26 \pm 11,22$ mg/L (Figura 11).

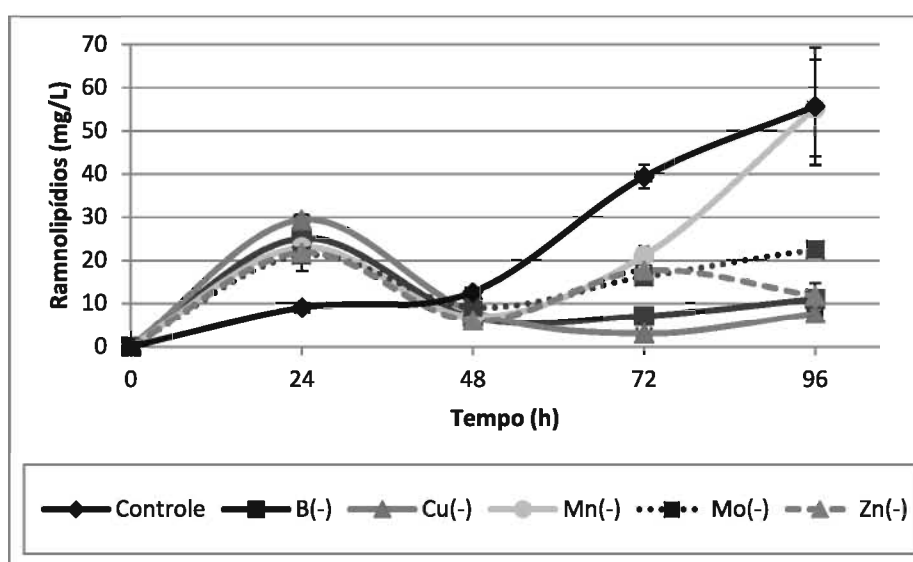


Figura 11: Produção de ramnolipídios (mg/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).

Com exceção do cultivo Mn (-), as demais fermentações, B (-), Cu (-), Mo (-) e Zn (-) apresentaram diferença estatística em relação ao controle (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em óleo de soja e ausência de cada um dos elementos traço.

Condição	Média (mg/L)	Probabilidade*
Controle	55,63 ± 13,60	-----
B(-)	11,13 ± 1,56	0,00546
Cu(-)	7,65 ± 0,64	0,00416
Mn(-)	55,26 ± 11,22	0,79343
Mo(-)	22,53 ± 0,67	0,02338
Zn(-)	11,86 ± 2,94	0,00594

* os valores em negrito apresentam diferença estatística

A maior concentração de biomassa encontrada nos cultivos B(-), Cu(-), Mo(-) e Zn(-) foram no tempo de 24 horas, atingindo os respectivos valores de $1,12 \pm 0,14$, $1,16 \pm 0,03$, $1,52 \pm 0,06$, $1,44 \pm 0,02$ g/L, seguido de queda na biomassa no tempo de 48 horas, e se estabilizando ao final da fermentação. Como mencionado anteriormente na condição controle, os maiores valores de biomassa foram encontrados nos tempos de 24 e 48 horas, seguidos de diminuição da mesma. Com relação ao cultivo Mn(-), o ápice do crescimento ocorreu no tempo de 96 horas, com $1,44 \pm 0,02$ g/L de células (Figura 12).

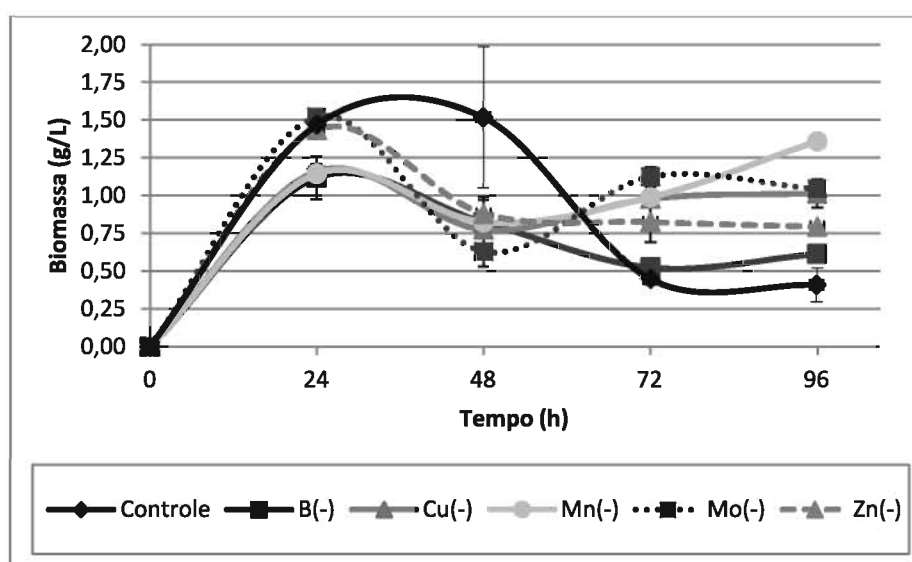


Figura 12: Biomassa (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).

Não foi possível determinar o consumo de óleo no tempo de 96 horas nos cultivos Mn(-), Mo(-), e Zn(-); pois, devido ao surgimento de uma emulsão durante a etapa da extração, não houve volume suficiente de amostra (2 mL) para a análise (Figura 13).

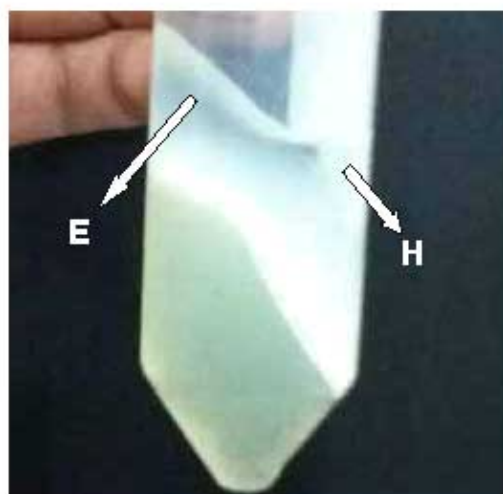


Figura 13: Emulsão (E) presente no processamento da amostra, que impossibilitou um volume suficiente de n-hexano (H) para análise de óleo residual.

Os menores valores de óleo residual nos ensaios onde não foi possível analisar o tempo de 96 horas ocorreram em 72 horas de cultivo, com os valores de $2,03 \pm 0,95$ g/L - Mn(-), $12,88 \pm 5,41$ g/L - Mo (-) e $15,80 \pm 1,48$ g/L - Zn (-). A concentração final de óleo foi próxima a zero no tempo final de fermentação, atingindo $0,20 \pm 0,00$ g/L para o cultivo B(-) e $0,15 \pm 0,00$ g/L para Cu(-). O grupo controle como anteriormente descrito atingiu a menor concentração de óleo residual, logo após 24 horas, com $4,55 \pm 2,55$ g/L (Figura 14).

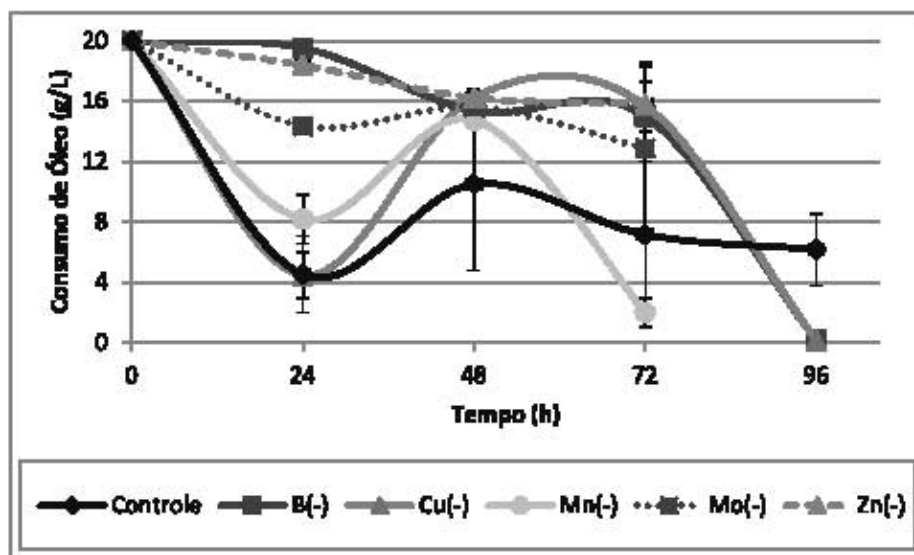


Figura 14: Consumo de óleo (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).

5.2.C. Avaliação dos elementos citrato e cobalto na produção de ramnolipídios a partir de óleo de soja

A partir da Figura 15 pode-se observar o aspecto do meio de cultura nos tempos finais da fermentação, onde foram adicionados os elementos citrato e/ou cobalto. Em todos os ensaios, o cultivo apresentou uma coloração bege e consistência densa.

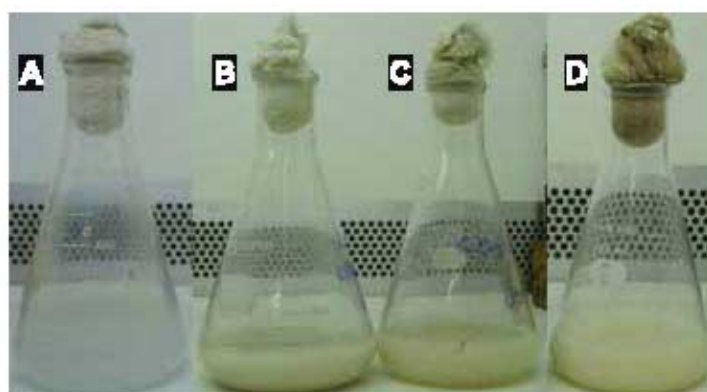


Figura 15: Cultivo de *P. aeruginosa* LBI utilizando óleo de soja como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com a adição de citrato (B), cobalto (C) e ambos (D).

O ensaio onde foi adicionado o elemento cobalto ao meio, apresentou uma produção de ramnolipídios superior ao controle em todos os tempos de cultivo,

porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa no final da fermentação, a concentração de tensoativo atingiu $80,83 \pm 0,68$ mg/L, em comparação com $55,63 \pm 13,60$ mg/L do ensaio controle (Figura 16 e Tabela 7).

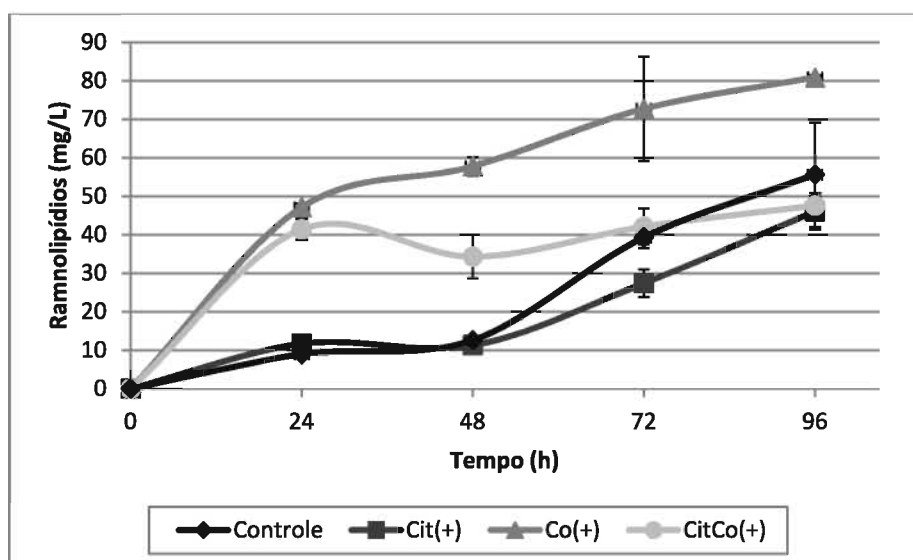


Figura 16: Produção de ramnolipídios (mg/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.

Tanto nos ensaios com a adição de citrato - Cit (+) e de citrato e cobalto - CitCo(+), a maior concentração de ramnolipídios no meio foi quantificada no tempo de 96 horas, atingindo $46,06 \pm 4,73$ e $47,59 \pm 2,46$ mg/L , respectivamente; porém, estes valores foram inferiores ao cultivo controle (Figura 16).

Tabela 7: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em óleo de soja e adição de citrato e/ou cobalto.

Condição	Média (mg/L)	Probabilidade
Controle	$55,63 \pm 13,60$	-----
Cit(+)	$46,06 \pm 4,73$	0,70974
Co(+)	$80,83 \pm 0,68$	0,05341
CitCo(+)	$47,59 \pm 2,46$	0,79622

O crescimento da bactéria no cultivo Cit(+) foi máximo em 24 horas, $1,18 \pm 0,40$ g/L, seguido de declínio no decorrer da fermentação. A concentração máxima

de biomassa no ensaio controle ($1,52 \pm 0,47$ g/L) e CitCo (+) ($1,65 \pm 0,08$ g/L) foi alcançada no tempo de 48 horas. Após atingir o pico, foi observado queda na curva de crescimento da bactéria nos experimentos controle, o mesmo não ocorreu com o CitCo(+), que apresentou um aumento da biomassa entre os tempos de 72 e 96 horas. Já o cultivo Co(+), apresentou um aumento da concentração de biomassa até 72 horas, atingindo $1,47 \pm 0,16$ g/L, seguido de queda no crescimento no final da fermentação (Figura 17).

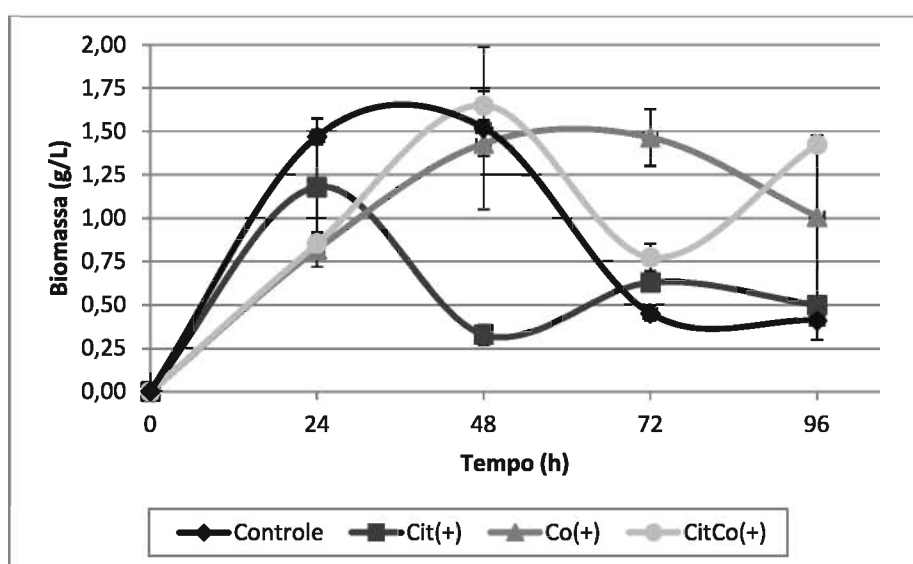


Figura 17: Biomassa (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.

O maior consumo de óleo nos ensaios Cit(+) - $3,85 \pm 0,14$ g/L e Co(+) - $4,40 \pm 1,98$ g/L foi em 96 horas de cultivo. Entretanto, no cultivo controle a menor medida de óleo residual foi encontrada no tempo de 24 horas com $4,55 \pm 2,55$ g/L, e no ensaio CitCo(+), em 48 horas com $1,95 \pm 0,11$ g/L (Figura 18).

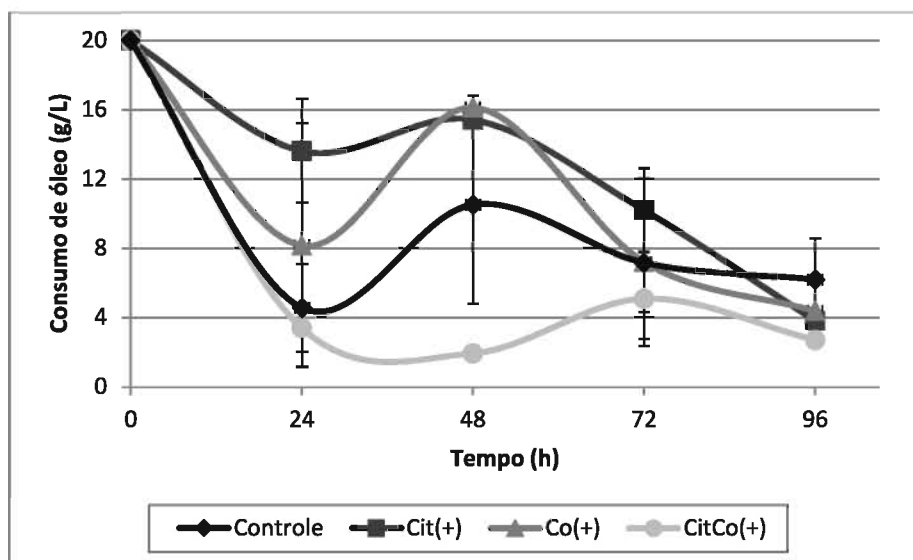


Figura 18: Consumo de óleo (mg/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo óleo de soja, cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.

5.3. Cultivos com glicerina

Os resultados referentes aos ensaios contendo glicerina P.A. como fonte de carbono serão expostos a seguir. Os dados obtidos nos experimentos onde foi avaliado a produção de ramnolipídios em diferentes concentrações da solução de elementos traço adicionadas ao meio, serão demonstrados no item 5.3.A. A influência individual de cada elemento traço estudado será apresentada no item 5.3.B. A etapa final do trabalho, com a adição de novos elementos ao cultivo, citrato e cobalto, será apresentada no item 5.3.C. As produções de ramnolipídios, biomassa, e consumo de óleo estão representados em gráficos e a estatística aplicada nas médias do tempo final (96 horas) em tabelas.

5.3.A. Variação da concentração da solução de elementos traço no meio com glicerina P.A.

Como podemos visualizar na Figura 19, em todos os cultivos a linhagem de *P. aeruginosa* LBI foi capaz de assimilar a fonte de carbono e se replicar, uma vez que, houve uma grande diferença de coloração entre os ensaios não inoculados e após 96 horas de fermentação.

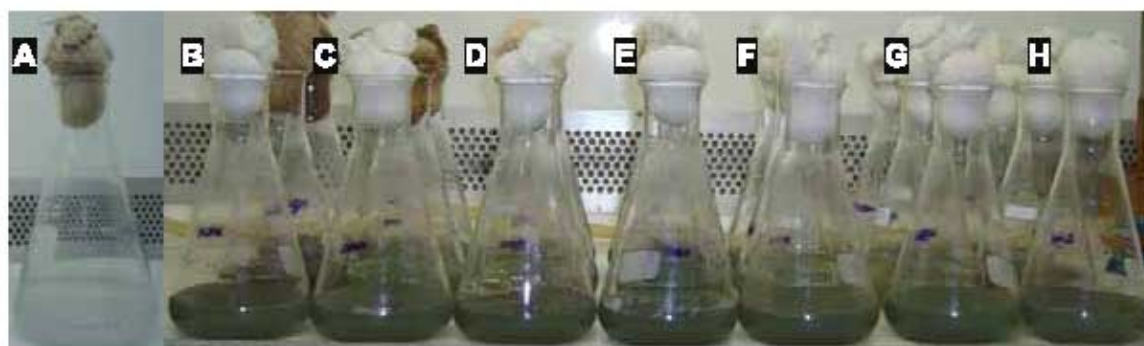


Figura 19: Cultivo de *P. aeruginosa* LBI utilizando glicerina P.A. como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, em diferentes concentrações ($\mu\text{L/L}$) de solução de elementos traço no meio, 50 (B), 500 (C), 1.000(D), 1.500(E), 2.000 (F), 2.500(G) e 3.000 (H).

A maior produção encontrada no tempo de 96 horas foi com o cultivo onde se utilizou 50 $\mu\text{L/L}$ da solução de elementos traços, alcançando $129,11 \pm 11,92 \text{ mg/L}$, seguida pelos cultivos com 1.500, 1.000 e 500 $\mu\text{L/L}$, com os respectivos valores de $78,26 \pm 3,02$, $55,61 \pm 41,50$ e $19,90 \pm 0,97 \text{ mg/L}$ (Figura 20).

Os cultivos onde foram adicionados os maiores volumes da solução traço tiveram as menores concentrações de ramnolipídios, $5,77 \pm 2,37 \text{ mg/L}$ (2.000 $\mu\text{L/L}$), $17,74 \pm 4,36 \text{ mg/L}$ (2.500 $\mu\text{L/L}$) e $13,71 \pm 7,38 \text{ mg/L}$ (3.000 $\mu\text{L/L}$) (Figura 20).

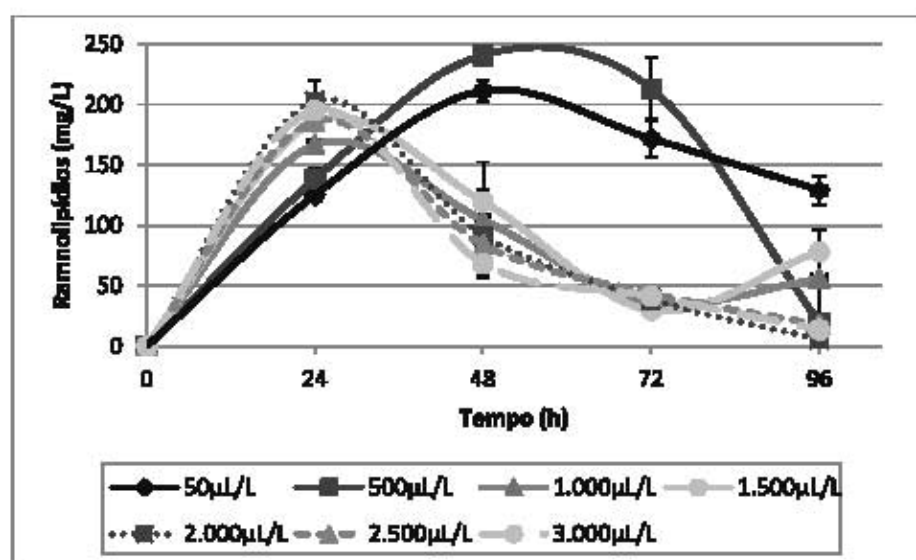


Figura 20: Produção de ramnolipídios (mg/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.

Em nenhum dos ensaios a maior produção foi encontrada no final da fermentação, os cultivos com 50 e 500 $\mu\text{L/L}$, alcançaram $211,19 \pm 8,87$ e $240,79 \pm 5,88$ mg/L, após 48 horas de fermentação. Os demais ensaios apresentaram sua maior concentração de ramnolipídios no tempo de 24 horas, atingindo os seguintes valores $166,74 \pm 4,77$ mg/L para o cultivo com 1.000 $\mu\text{L/L}$ da solução de elementos traço; $185,40 \pm 0,96$ mg/L com 1.500 $\mu\text{L/L}$; $202,93 \pm 17,37$ mg/L com 2.000 $\mu\text{L/L}$; $186,12 \pm 17,35$ mg/L com 2.500 $\mu\text{L/L}$; e $194,98 \pm 13,79$ mg/L com 3.000 $\mu\text{L/L}$ (Figura 20).

A Tabela 8 apresenta os resultados do teste estatístico aplicado, onde podemos ver que o cultivo com 50 $\mu\text{L/L}$ atingiu a maior produção de ramnolipídios, e esta difere estatisticamente de todos os outros ensaios, com exceção do cultivo com 1.500 $\mu\text{L/L}$. Sendo assim, a concentração de 50 $\mu\text{L/L}$ foi escolhida como controle para dar sequência aos experimentos com glicerina P.A..

Tabela 8: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em glicerina P.A. e diferentes volumes de solução de elementos traço.

Condição ($\mu\text{L/L}$)	Média (mg/L)	Probabilidade
50	$129,11 \pm 11,92$	-----
500	$19,90 \pm 0,97$	0,0034
1.000	$55,61 \pm 41,50$	0,03
1.500	$78,26 \pm 3,02$	0,1487
2.000	$5,77 \pm 2,37$	0,00163
2.500	$17,74 \pm 4,36$	0,00302
3.000	$13,71 \pm 7,38$	0,00244

* os valores em negrito apresentam diferença estatística

Os perfis de crescimento da linhagem *P. aeruginosa* LBI nos cultivos foram muitos semelhantes entre si, e seus valores permaneceram muito próximos nos diferentes tempos da fermentação. Os ensaios com os menores volumes de solução adicionados alcançaram seus maiores valores ao final da fermentação, sendo eles, $1,53 \pm 0,08$ g/L (50 $\mu\text{L/L}$), $1,81 \pm 0,04$ g/L (500 $\mu\text{L/L}$) e $1,89 \pm 0,06$ g/L (1000 $\mu\text{L/L}$) (Figura 21).

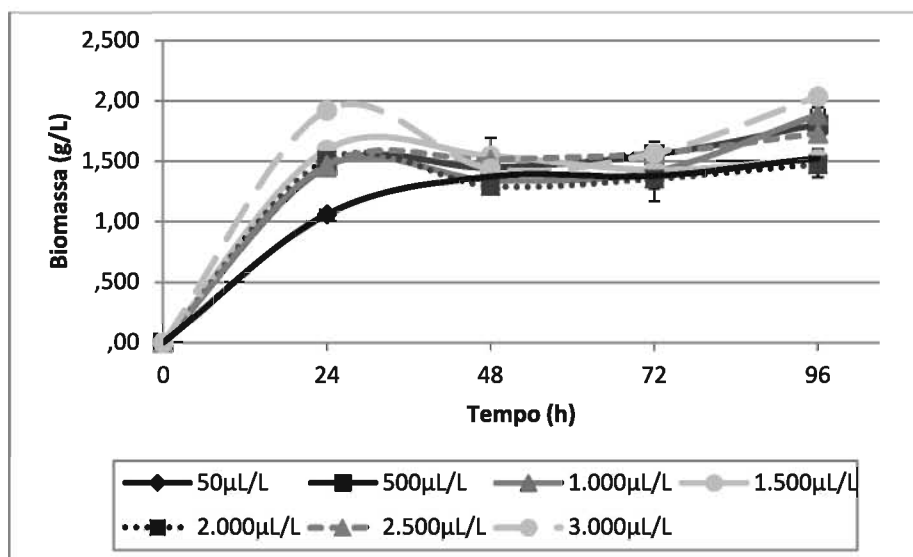


Figura 21: Biomassa (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada em diferentes concentrações de solução de elementos traço no meio.

Os cultivos com adição de 1.500 e 2.000 µL/L de solução de elementos traços, apresentaram pico de crescimento em 24 horas de cultivo, atingindo $1,60 \pm 0,04$ e $1,51 \pm 0,07$ g/L, respectivamente. Nos experimentos onde se utilizou os maiores volumes da solução de elementos traços, a concentração máxima de biomassa ocorreu em 96 horas e foi igual a $1,73 \pm 0,06$ (2.500 µL/L) e $2,04 \pm 0,05$ (3.000 µL/L) (Figura 21).

5.3.B. Avaliação da importância de cada elemento traço para a produção de ramnolipídios utilizando glicerina P.A. como fonte de carbono

A diferença na coloração dos diferentes ensaios, observada na Figura 22, pode evidenciar a importância dos elementos traço, quando comparada aos cultivos da Figura 19, onde todos os elementos foram fornecidos. Nas fermentações em que todos os elementos traço estavam presentes, os meios apresentaram coloração verde intensa, característica de cultivos em glicerina, em boas condições. Por outro lado, nos cultivos com a ausência dos elementos traços, há cultivos com coloração escura, como por exemplo, B (-) e Zn (-), o que de acordo com Hassen et al., (1998), é característico de culturas mais velhas, que apresentam morte celular. Os demais ensaios apresentaram coloração verde claro.



Figura 22: Cultivo de *P. aeruginosa* LBI utilizando glicerina P.A. como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com ausência de cada um dos elementos traços, boro (B), cobre (C), manganês (D), molibdênio (E) e zinco (F).

Todos os cultivos realizados na ausência de cada um dos elementos traço apresentaram produção menor de ramnolipídios ao final da fermentação. O ensaio controle atingiu uma concentração de $129,11 \pm 11,92$ mg/L de biossurfactante, enquanto a produção nos demais ensaios foi a seguinte B(-) - $13,19 \pm 1,16$ mg/L; Cu(-) - $16,37 \pm 4,14$ mg/L; Mn(-) - $8,27 \pm 0,99$ mg/L; Mo(-) - $41,18 \pm 7,38$ mg/L e Zn(-) - $15,86 \pm 6,54$ mg/L (Figura 23).

As maiores concentrações de ramnolipídios ocorreu no tempo de 24 horas na maioria dos ensaios, sendo de $160,90 \pm 3,36$ mg/L em B(-), $150,59 \pm 3,99$ mg/L em Cu(-), $180,13 \pm 9,67$ mg/L em Mn(-) e $203,92 \pm 14,62$ mg/L em Mo(-). No entanto, o cultivo Zn (-) alcançou sua maior produção no tempo de 48 horas, atingindo $157,19 \pm 34,09$ mg/L de ramnolipídios (Figura 23).

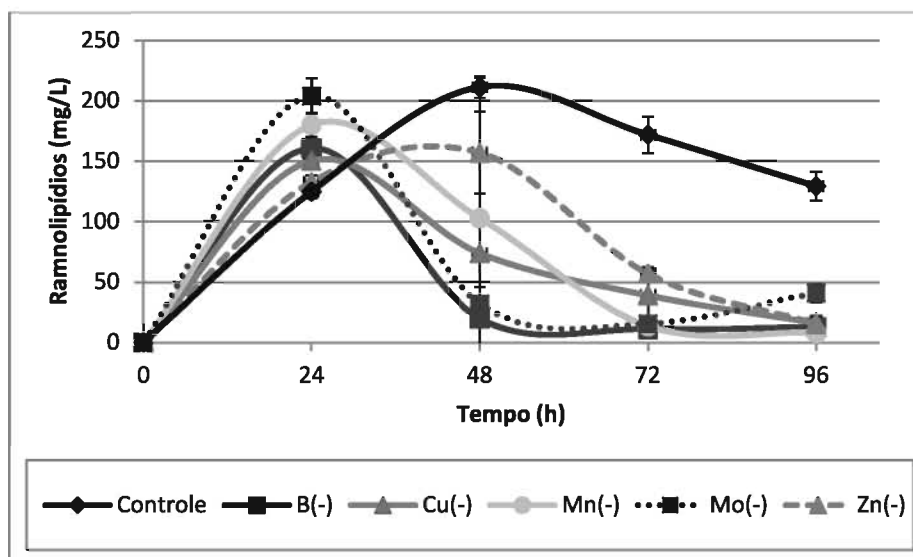


Figura 23: Produção de ramnolipídios (mg/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).

A Tabela 9 demonstra a importância de todos os elementos traços no cultivo com glicerina P.A., pois o grupo controle apresentou, após 96 horas, uma produção de ramnolipídios, estatisticamente superior às encontradas nos cultivos com ausência de cada um dos elementos.

Tabela 9: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em glicerina P.A. e ausência de cada um dos elementos traço.

Condição	Média (mg/L)	Probabilidade
Controle	129,11 ± 11,92	-----
B(-)	13,19 ± 1,16	1,7 x 10⁻⁵
Cu(-)	16,37 ± 4,14	2,0 x 10⁻⁵
Mn(-)	8,27 ± 0,99	1,3 x 10⁻⁵
Mo(-)	41,18 ± 7,38	8,8 x 10⁻⁵
Zn(-)	15,86 ± 6,54	1,9 x 10⁻⁵

* os valores em negrito apresentam diferença estatística

A produção de biomassa se estabilizou após 24 horas de cultivo, e os maiores valores encontrados para os cultivos controle ($1,53 \pm 0,08$ g/L), B(-) ($1,79 \pm 0,01$ g/L)

e Mo(-) ($1,81 \pm 0,02$ g/L), foram no tempo de 96 horas. Já os cultivos Cu(-) e Zn (-) atingiram $1,36 \pm 0,09$ e $1,54 \pm 0,18$ g/L de biomassa em 72 horas. Somente o ensaio Mn(-) teve sua maior produção no tempo de 48 horas, sendo de $1,62 \pm 0,14$ g/L (Figura 24).

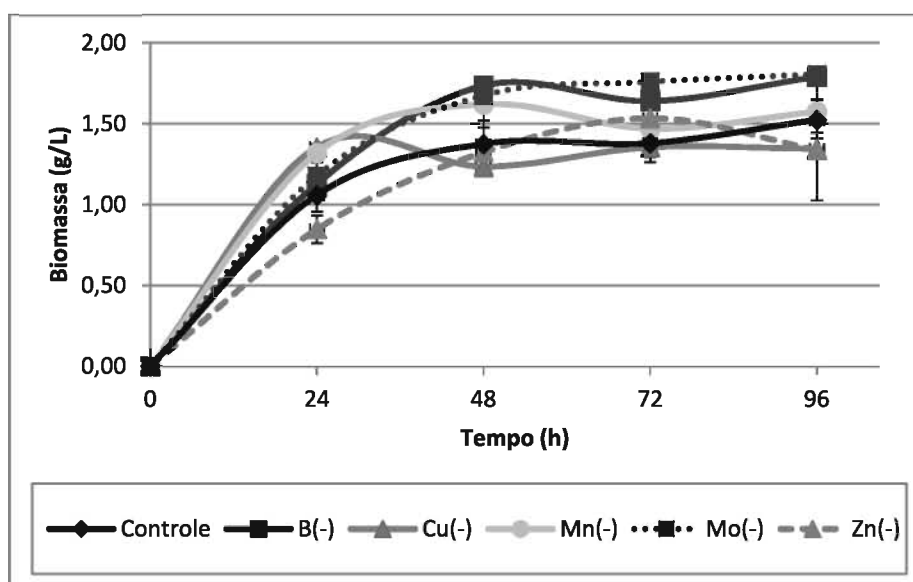


Figura 24: Biomassa (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada na ausência de cada um dos elementos traços (B, Cu, Mn, Mo e Zn).

5.3.C. Avaliação dos elementos citrato e cobalto na produção de ramnolipídios utilizando glicerina P.A. como fonte de carbono

A Figura 25 apresenta o aspecto final dos cultivos onde foram adicionados dois novos elementos ao meio, citrato e/ou cobalto. O cultivo com citrato (Figura 25B) apresentou coloração verde mais escura, quando comparados com os ensaios Co(+) e CitCo(+), (Figura 25C e 25D).

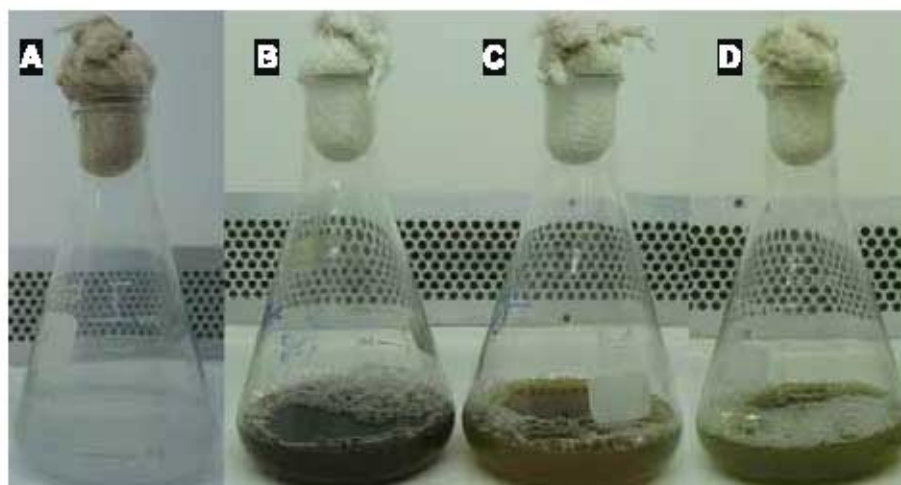


Figura 25: Cultivo de *P. aeruginosa* LBI utilizando glicerina P.A. como única fonte de carbono, antes da inoculação (A) e após 96 horas, com a adição de citrato (B), cobalto (C) e ambos (D).

Os valores finais das fermentações onde se adicionaram novos elementos ao cultivo foram significativamente diferentes ao grupo controle, como podemos visualizar na Tabela 10.

Tabela 10: Comparação estatística entre as médias das concentrações de ramnolipídios (mg/L) obtidas ao final de 96 horas de cultivo em glicerina P.A. e adição de citrato e/ou cobalto.

Condição	Média (mg/L)	Probabilidade
Controle	129,11 ± 11,92	—
Cit(+)	20,63 ± 4,14	0,00031
Co(+)	27,17 ± 4,12	0,0004
CitCo(+)	7,33 ± 4,58	0,00019

* os valores em negrito apresentam diferença estatística

A produção no tempo de 96 horas do cultivo controle foi de 129,11 ± 11,92 mg/L de ramnolipídios, em comparação com os cultivos Cit(+), Co(+) e CitCo(+), onde as produções de ramnolipídios no final da fermentação foram de respectivamente, 20,63 ± 4,14, 27,17 ± 4,12 e 7,33 ± 4,58 mg/L (Figura 26).

No caso dos cultivos Cit(+), Co(+) e CitCo(+), as maiores concentrações de ramnolipídios foram encontradas no tempo de 24 horas e o grupo controle alcançou a maior produção de 211,19 ± 8,87 no tempo de 48 horas (Figura 26).

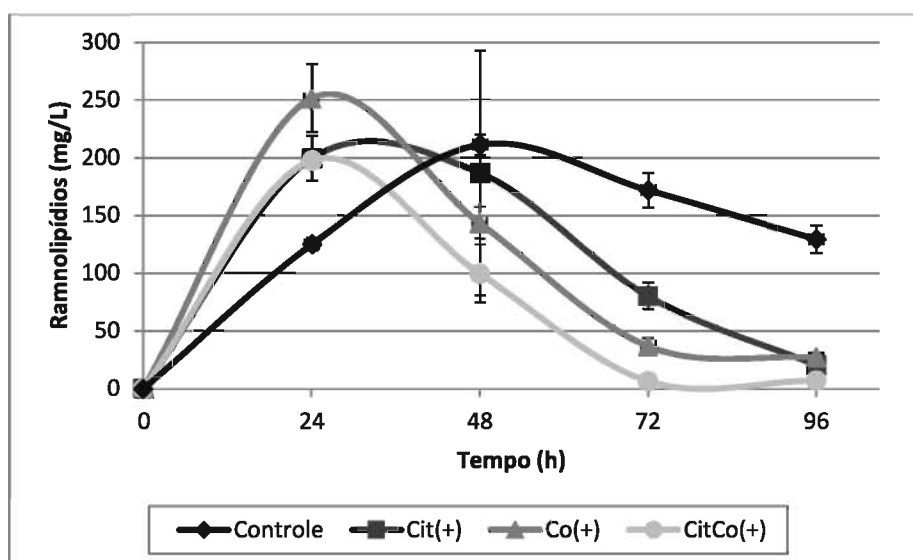


Figura 26: Produção de ramnolipídios (mg/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.

Neste grupo de ensaios o crescimento da bactéria se estabilizou após 48 horas de cultivo. As maiores concentrações de biomassa foram detectadas em 96 horas e atingiram $1,53 \pm 0,08$ g/L para o cultivo C(+) e $1,71 \pm 0,01$ g/L para Cit(+). Já as fermentações Co(+) e CitCo(+), alcançaram seus maiores valores em 72 horas, com $1,74 \pm 0,15$ e $1,77 \pm 0,01$ g/L de biomassa (Figura 27).

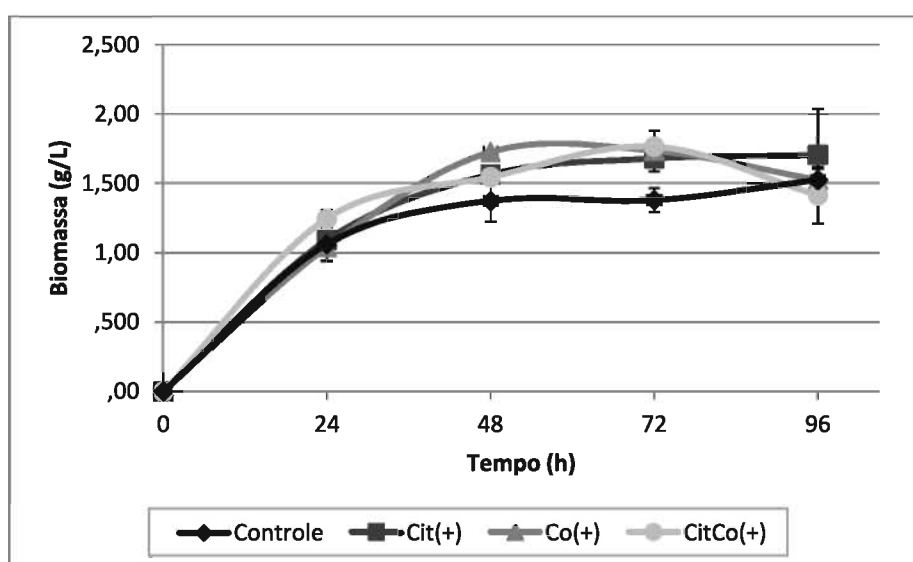


Figura 27: Cinética da produção de biomassa (g/L) da bactéria *P. aeruginosa* LBI em meio contendo glicerina P.A., cultivada com o acréscimo de citrato, cobalto e ambos.

Observa-se que adição dos novos elementos, não favoreceu a produção do biossurfactante, quando a glicerina foi utilizada como fonte de carbono. Entretanto, a biomassa manteve-se mais estável nos cultivos onde houve a adição de cobalto e/ou citrato. Por isso, o ajuste da concentração destes elementos poderia tornar-se favorável à produção de ramnolipídios.

Segundo Soberón-Chávez et al. (2005), altas concentrações de cátions divalentes é inibitório para a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*. Este fato não pode ser visualizado nos cultivos com óleo de soja, pois as maiores produções finais de ramnolipídios encontram-se tanto no cultivo com menos elementos traços (50 µL/L), quanto na fermentação com a maior concentração destes (3.000 µL/L). Porém, nos ensaios com glicerina, a diferença entre os valores de produção pode ter sido causada pela inibição causada por cátions divalentes, uma vez que, o cultivo com a menor quantidade destes, foi o que alcançou a maior produção final de ramnolipídios.

Apesar da ausência de referências bibliográficas que indiquem uma relação direta dos metais traço estudada, com a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*, o que se sabe é que esses elementos tem influência indireta com este metabólito, já que estão envolvidos com processos necessários para a manutenção e composição celular. Os resultados obtidos comprovam a importância dos elementos traços, pois com ambas as fontes de carbono, a produção final de ramnolipídios foi menor na ausência de cada um dos elementos, com exceção do cultivo Mn(-) com óleo de soja.

Segundo Martins et al. (1989) íons metálicos podem atuar como mediadores em potencial nos mecanismos de controle, ao nível da transcrição ou tradução de uma ou mais enzimas envolvidas no metabolismo de *P. aeruginosa*, ou na ativação e estabilização de enzimas pré-formadas. E a produção de ramnolipídios pode estar relacionada com algumas destas enzimas e mecanismos de controle.

Madigan et al. (2010) afirma que o cátion Zn^{2+} está envolvido com o funcionamento de diversas enzimas necessárias à manutenção e replicação celular, como por exemplo: anidrase carbônica; álcool desidrogenase; RNA e DNA polimerase e muitas proteínas de ligação ao DNA. Hassen et al. (1998) demonstram que os cátions metálicos exercem grande influência na síntese protéica, sendo Zn^{2+} um estimulante para produção de proteínas em *P. aeruginosa*, na concentração de 0,5 mM. Os mesmos autores afirmam que concentrações de 0,5 mM de cobre,

estimulam o crescimento celular. Apesar da influência do cátion Zn^{2+} na manutenção e replicação celular acima demonstrada, o mesmo não pode ser visualizado nos experimentos realizados com a ausência de tal elemento, pois os perfis de biomassa, em ambas as fontes de carbono, são semelhantes aos obtidos nos ensaios controles.

De acordo com Eagon et al. (1965), o Zn^{2+} está presente em componentes da parede celular, juntamente com Ca^{2+} e Mg^{2+} . Sendo assim, a ausência de zinco pode alterar a composição da parede celular, resultando em modificações no metabolismo através da regulação de entrada e saída de moléculas, bem como, em outros fatores como aderência e hidrofobicidade da superfície celular. Este fato pode explicar a baixa produção de ramnolipídios nos cultivos na ausência do cátion zinco, pois mudanças na seletividade da parede celular, bem como na hidrofobicidade da superfície celular, pode alterar a assimilação das fontes de carbono e de outros nutrientes, bem como, a liberação de ramnolipídios para o meio extracelular.

Segundo Antholine et al. (1993), o cobre está presente em proteínas chamadas de azurinas, e estas estão envolvidas na transferência de elétrons em *P. aeruginosa*. Karapetian; Kamalian e Nalbandyan (1986) afirmam que em *P. aeruginosa* há associação de cobre com proteínas inibidoras da nitrato reductase. Tanto a transferência de elétrons como a assimilação de nitrogênio são processos importantes para a manutenção e replicação celular, e sua inibição pode causar um déficit na produção de ramnolipídios. Outro metal envolvido com a nitrato redutase é o molibdênio, que estimula a atividade desta enzima em linhagens de *E. coli*, *Aspergillus nidulans* e *P. aeruginosa* (VAN HARTINGSVELDT; STOUTHAMER, 1973; FEWSON; NICHOLAS 1961). Elevadas proporções C/N (GUERRA-SANTOS; KÄPPELI; FIECHTER, 1984; RAZA et al., 2007; WU et al., 2007) estimula a síntese de ramnolipídios e a enzima nitrato redutase está relacionada com a assimilação e concentração de nitrogênio do meio.

A adição de Mn^{2+} foi relatada como necessária para ativação de fosfomutases e enzimas que requerem ATP. Sua presença é capaz de aumentar a produção de alginato, além de evitar a morte prematura das células no cultivo (MARTINS et al, 1989). Sendo assim, a ausência do manganês no cultivo com óleo de soja pode ter incentivado a formação de ramnolipídios, uma vez que, a produção do alginato não foi estimulada, e este é um produto cujo metabolismo compete com o dos ramnolipídios. Segundo Nelson e Cox (2006) o manganês (Mn^{2+}), está envolvido

como co-fator na ativação de enzimas presentes no ciclo do ácido cítrico, e este está relacionado com a produção da porção hidrofílica do ramnolipídio, quando a linhagem produtora é cultivada em fontes hidrofóbicas como fonte de carbono. No ciclo do glioxilato a acetil-CoA é convertida à succinato, que é transformado em malato no ciclo do ácido cítrico. O malato é oxidado à oxaloacetato que pela gliconeogênese é convertido em hexoses e posteriormente à ramnose (Figura 3). Porém, tal fato não pode ser visualizado no cultivo sem a presença de manganês e utilização de uma fonte de carbono hidrofóbica, pois, a produção de ramnolipídios no cultivo Mn(-) e controle foram muito próximas entre si. Asbell e Eagon et al. (1966) afirmam que Mn^{2+} não é um componente da parede celular, porém em certas condições é capaz de substituir o Ca^{2+} e Mg^{2+} presente como estabilizadores da parede celular. Discussão sobre alginato que é rota concorrente

A adição de novos elementos (citrato e/ou cobalto) ao cultivo com glicerina foi inibitória, uma vez que os valores finais de produção de ramnolipídios foram inferiores ao ensaio controle. Com relação aos ensaios com óleo de soja como fonte de carbono, o cultivo Co (+) apresentou uma maior produção no tempo final, porém, esta não foi diferente estatisticamente ao cultivo controle

Sendo assim, a adição de citrato, cobalto ou ambos, ao meio de Sais de Robert não apresenta resultados positivos quanto à produção de ramnolipídios quando *P. aeruginosa* é cultivada em glicerina. O mesmo não pode ser afirmado para ensaios contendo óleo de soja, pois apesar da produção de ramnolipídios com a presença de cobalto não ter diferido estatisticamente do grupo controle, esta foi maior, e possivelmente após maiores estudos com a determinação da concentração ideal de cobalto no meio, a produção do biossurfactante aumente.

Tanto o citrato, como o cobalto, são elementos que desempenham funções que podem estar relacionadas à síntese do biossurfactante. Como exposto pela Tabela 1, o cobalto é um elemento constituinte da vitamina B12, que participa da síntese das desoxirriboses, e são constituintes do DNA (MADIGAN et al, 2009). E o citrato faz parte do ciclo do ácido cítrico e ciclo do glioxilato, etapas presentes na biossíntese dos ramnolipídios, quando obtidos a partir de fontes oleosas.

6. CONCLUSÕES

- A concentração de 50 $\mu\text{L/L}$ de solução de elementos traço no meio, foi a que permitiu a obtenção dos melhores resultados em ambas as fontes de carbono.
- Nos cultivos com óleo de soja como fonte de carbono a ausência de cada um dos elementos é prejudicial à produção de ramnolipídios, com exceção do manganês.
- A ausência de cada um dos elementos traço é prejudicial para a produção de ramnolipídios, quando se utiliza glicerina P.A. como fonte de carbono.
- A adição de citrato, cobalto ou ambos, não exerce resultados positivos na produção de ramnolipídios quando se utiliza o meio Sais de Robert, contendo glicerina, quando analisado o tempo final da fermentação.
- A produção de ramnolipídios a partir de óleo de soja pode ser estimulada pela adição do elemento cobalto ao meio, porém são necessários mais estudos para se determinar sua concentração ideal.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar experimentos variando as concentrações de citrato e cobalto em ambas as fontes de carbono, com um intervalo de amostragem menor;
- Determinar a composição ideal de soluções traços para diferentes fontes de carbono e
- Realização de experimentos em biorreator

8. REFERÊNCIAS

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: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, Washington, v.17, n.5, p.1367-1371, 2001.

ABDEL-MAWGOUD, A.M; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 86, p. 1323-36, 2010.

ABDEL- MAWGOUD, A.M.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MÜLLER, M.M.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation and bioengineering of production: In: Soberón-Chavez Glória (Ed.) **Biosurfactants from genes to application**. 1ª ed. 2011, p. 13 - 55.

ANTHOLINE, W. E.; HANNA, P. M.; MCMILLINT, D. R., Low frequency EPR of *Pseudomonas aeruginosa* azurin, Analysis of ligand superhyperfine structure from a type 1 copper site. **Biophys. J.** v. 64, p. 267-272, 1993

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.

ASBELL, M. A.; EAGON, R. G. Role of Multivalent Cations in the Organization, Structure, and Assembly of the Cell Wall of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 92, p. 380-387, 1966.

ATTILA, C.; UEDA, A.; CIRILLO, S.L.G.; CIRILLO, J. D.; CHEN, W.; WOOD, T. K. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence factors and poplar tree response in the rhizosphere. **Microbial Biotechnology**, v. 1 n. 1, p.17-29, 2008.

AUDENAERT, K.; PATTERY, T.; CORNELIS, P.; HÖFTE, M. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role

of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, n. 11, p. 1147-1156, 2002.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.53, n.5, p.495-508, 2000.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.54, n.4, p.283-288, 2002.

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

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: “Uma Resposta dos Microorganismos”. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.

BODEY, G.P.; BOLIVAR, R.; FAINSTEIN, V.; JADEJA, L. Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**, v.5, n.2, p. 279-313, 1983.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.152, n.1, p.41-52, 1999.

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**, v. 73, n 2, 2005.

CHANG, J.S.; CHOU, C.L.; LIN, G. H.; SHEU, S. Y.; CHEN, W.M. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. **System. and Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 2, p. 137-144, 2005.

CHOUDHARY, S.; SAR, P. Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 336-343, 2011.

CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World J. Microbiol Biotechnol**, v 28, n 2, p 401–419, 2012.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Rhamnolipid biosurfactant production using brazilian oils. **Process Biochemistry** v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 34-38, 2008.

COSTA, S.G.V.A.O.; DE SOUZA, S.R.; NITSCHKE, M.; FRANCHETTI, S.M.M.; JAFELICCI, M.; LOVAGLIO, R.B.; CONTIERO, J. Wettability of Aqueous Rhamnolipids Solutions Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **J. Surfact. Deterg**, v. 12, p. 125-130, 2009.

DE MEYER,G.; CAPIEAU, K.; AUDENAERT, K.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.P.; HÖFTE, M. Nanogram Amounts of Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Activate the Systemic Acquired Resistance Pathway in Bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n. 5, p. 450-458, 1999.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1339-1345, 2007.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nova York, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A.J. Production of Biosurfactants. In: Kosaric, N. (Org.). **Biosurfactants: Production, Properties, Applications**. Nova York: Marcel Decker, p. 65-97. 1993.

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

FERNDÁNDEZ, R.O.; PIZARRO, R.A. High-performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. **Journal of Chromatography A**, v. 771, p. 99-104, 1997.

FEWSON, C. A.; NICHOLAS, D. J. D. Nitrate reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 49 p. 335-349, 1961

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

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, n.3, p.379-387, 2000.

HARDALO, C., EDBERG, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 47-75, 1997.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIFH M.; BOUDABOUS, A. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology** v.65, p. 73-82, 1998

HERM, B.H.A. Biotechnological Relevance of *Pseudomonas*: In: REHM, B.H.A. (Ed.) ***Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory**. 1ª ed, 2008, p. 377-391.

HOANG T.T; SCHWEIZER H.P. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the fabAB operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-Ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 5326-5332, 1997.

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

KANG, S.Y.; LEE, J.U.; KIM, K.W. Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 54-58, 2007.

KARAMALIDIS, A.K.; EVANGELOU, A.C.; KARABIKA, E.; KOUKKOU, A.I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E.A. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6545-6552, 2010.

KARAPETIAN A.V.; KAMALIAN M.G.; NALBANDYAN R.M. A copper-containing protein that inhibits nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Elsevier Science Publishers B. V.** v.203, p. 131-134, 1986

KIIL, K.; BINNEWIES, T.T.; WILLENBROCK, H.; HANSEN, S. K.; YANG, L.; JELSBK, L.; USSERY, D.W.; FRIIS, C. Comparative Genomics of *Pseudomonas*: In: REHM, B.H.A. (Ed.) ***Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory**. 1ª ed, 2008, p. 1.

KONG, B.; TANG, B.; LIU, X.; ZENG, X.; DUAN, H.; LUO, S.; WEI, W. Kinetic and equilibrium studies for the adsorption process of cadmium(II) and copper(II) onto *Pseudomonas aeruginosa* using square wave anodic stripping voltammetry method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 455-460, 2009.

KOSARIC, N., CAIRNS, W. L. Biosurfactants and biotechnology, **Marcel Dekker**, New York. p. 21-46 e 47-88, 1987.

KUMAR, C. G.; MAMIDYALA S. K. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 84, p. 462-466, 2011.

GABR, R.M.; HASSAN, S.H.A.; SHOREIT, A.A.M. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 62, p.195-203, 2008.

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

GARCIA-CRUZ, C.H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008

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

GUSTAFSSON S; HULTBERG M; FIGUEROA R. ; RENGEFORS K. On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. **Harmful Algae** v.8, p. 857-863, 2009

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

LATIFI, A.; FOGLINO, M.; TANAKA, K.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the

transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. **Mol. Microbiol.**, Salem, v. 21, n. 6, p. 1137 – 1146, 1996.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L; MAYERL, F; Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnol Bioeng** v. 33, p. 365–368, 1989.

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

LOVAGLIO, R.B.; FRANCISCO J. S.; 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 *P. aeruginosa* LBI [Tese]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista; 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2010.

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.

MARTINS, L. O.; BRITO, L. C.;SÁ-CORREIA, I. Roles of Mn²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme Microb. Technol**, v. 12, p. 794-799, 1990.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography**, v.864, p. 211-220, 1999.

MATOS, A.; KERKHOF, L.; GARLAND, J.L. Effects of Microbial Community Diversity on the Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the Wheat Rhizosphere. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 257-264, 2005.

MAYER, R.M.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.54, n.5, p.625-633, 2000.

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

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

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ª edição. New York : W. H. Freeman and Company, 2006.

NIE, M.; YIN, X.; REN, C.; WANG, K.; XU, F.; SHEN, Q. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 635-643, 2010.

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.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for

rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress.**, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002

OLVERA, C.; GOLDBERG, J.B.; SANCHEZ, R.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 85-90, 1999.

PASENAR, R.; PANESAR, P. S.; BERA, M.B. Development of low cost medium for the production of biosurfactants. **Asian Journal of Biotechnology**. 2011.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0,1% dirhamnolipid ointment. **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 12, p.142-146, 2008.

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

RAZA, Z.A.; KHAN, M.S.; KHALID, Z. M.; REHMAN, A. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.28, n. 20, p.1623-1631, 2006.

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

REIS, R.S.; PEREIRA, A.G.; NEVES, B.C.; FREIRE, D.M.G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. **Bioresour. Technol.**, v. 102, P. 6377-6384, 2011

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. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.1, n. 2, p.871-874, 1989.

RODRIGUES L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 57, p. 609-618, 2006

SOBERÓN-CHAVES, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.68, p. 718-725, 2005.

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

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

SILVA, B. H.; PIRÔLLO, M. P. S. ; LOVAGLIO, R.B. ; COSTA, S. G. V. B. O.; PIZZOLITTO, E. L.; CONTIERO, J. Factors affecting Rhamnolipids Production by *Pseudomonas Aeruginosa* LBI. **Research Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 45-49, 2008.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F.S.L.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K;

LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.-S.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S.; OLSON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.

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

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

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 772-778, 2011.

URUM, K.; GRIGSON, S.; PEKDEMIR, T.; MCMENAMY, S. **A comparasion of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils**. Chemosphere, v.62, p.1403-1410, 2006.

VAN HAESSENDONCK, I.P.H.; VANZEVEEREN, E.C.A.V. Rhamnolipids in bakery products. U.S. Pat. 0233935, 2006. 15p. apud NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Proc. Biochem.**, v. 46, p. 621-630, 2011.

VAN HARTINGSVELDT, J.; STOUTHAMER, A. H. Mapping and Characterization of Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* Affected in Nitrate Respiration in Aerobic or Anaerobic Growth. **Journal of General Micvobiology**, v. 74, p. 97-106, 1973

VISCA, P.; COLOTTI, G.; SERINO, L.; VERZILI, D.; ORSI, N.; CHIANCONE, E. Metal Regulation of Siderophore Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and Functional Effects of Siderophore-Metal Complexes. **Appl. Environ. Microbiol**, p.58, n. 9, 1992.

VESELOVA, M. A. Quorum Sensing Regulation in *Pseudomonas*, **Russian Journal of Genetics**, v. 46, p. 129–137, 2010.

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

WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, p. 182-191, 2009.

WORAKITSIRI, P.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; THANPITCHA T.; CHAVADEJ, S.; WEDER, C.; RUJIRAVANITA, R. Synthesis of polyaniline nanofibers and nanotubes via rhamnolipid biosurfactant templating. **Synthetic Metals** v. 161 p. 298–306, 2011

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.**, v. 99, n. 5, p. 1157-1164, 2007.

ZHU, K.; ROCK, C.O. RhIA Converts β -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Intermediates in Fatty Acid Synthesis to the β -Hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoate Component of Rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.9, p. 3147-3154, 2008.