
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mateus Aparecido Gonçalves da Rocha

**Produção de ramnolipídios por
Pseudomonas aeruginosa MPAO1 e de sua
mutante MPAO1 Δ rhIYZ, a partir de resíduos
agroindustriais**

Mateus Aparecido Gonçalves da Rocha

Produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 e de sua mutante MPAO1 Δ rhIYZ, a partir de resíduos agroindustriais

Orientador: Jonas Contiero

Co-orientador: Vinícius Luiz da Silva

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

Rio Claro
2020

R672p

Rocha, Mateus Aparecido Gonçalves da

Produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 e de sua mutante MPAO1 rhLYZ, a partir de resíduos agroindustriais / Mateus Aparecido Gonçalves da Rocha. -- Rio Claro, 2020

76 p.

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

Orientador: Jonas Contiero

Coorientador: Vinícius Luiz da Silva

1. Biossurfactante. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Fonte de carbono. 4. Agroindústria. 5. Beta-oxidação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RESUMO

Os biossurfactantes são metabólitos sintetizados por diversos tipos de micro-organismos, a partir de condições aeróbicas em meios contendo carboidratos, hidrocarbonetos, lipídios e outros. São moléculas anfipáticas, apresentando uma calda hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica, garantindo as mesmas aplicações que o surfactante químico, ainda acrescido de outras vantagens, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, estabilidade térmica, e produção a partir de fontes renováveis. Dentre os biossurfactantes, um dos mais estudados são os ramnolipídios, um tipo de biotensioativo que apresenta uma ou duas ramnoses na porção hidrofílica da molécula, sintetizado pela bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. As vantagens dos biossurfactantes para o micro-organismo produtor ainda são desconhecidas. Existem diversas hipóteses sobre sua atuação como, por exemplo, no caso da *Pseudomonas aeruginosa*, acredita-se que a produção de ramnolipídios esteja relacionada com a busca por ambientes ricos em nitrogênio. Isso parece estar relacionado ao aumento na produção do biossurfactante e de estruturas de locomoção quando o micro-organismo é submetido a ambientes com falta desse nutriente. A produção desse metabólito pode ainda estar relacionada com a produção de moléculas sinalizadora e com a colonização de ambientes oligotróficos. Apesar das vantagens dos biossurfactantes frente ao surfactante químico, seu uso não é amplo devido aos custos de produção e baixos rendimentos dos processos fermentativos. Estima-se que em um bioprocessamento a fonte de carbono corresponda a até 30% do custo final do produto. Dessa maneira, o uso de fontes provenientes da agroindústria é uma alternativa para a diminuição dos custos, além de ajudar no meio ambiente, uma vez que agrega valor a esses produtos que seriam descartados e que apresentam alta disponibilidade. Nesse projeto, foi avaliado a produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 e de sua mutante Δ rhIYZ, cultivadas em diversas fontes de carbonos: como melaço, óleo de fritura, borra de óleo de milho, borra de óleo de algodão, glicerol bruto e bidestilado.

Palavras-chave: Biossurfactante; Subprodutos industriais; *Pseudomonas aeruginosa*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biossurfactantes.....	5
1.2 Classificação e estrutura dos biossurfactantes.....	6
1.3 Fatores que influenciam na produção e biossíntese.....	8
1.3.1 Produção de biossurfactante.....	13
1.3.2 Substratos alternativos.....	14
1.4 Aplicações dos biossurfactantes.....	19

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivo específico.....	23

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo.....	24
3.2 Meio de cultura.....	24
3.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato.....	24
3.2.2 Meio Mineral livre de cálcio.....	24
3.3 Condições de cultivo	
3.3.1 Preparo do Inóculo.....	24
3.3.2 Bioprocessos em mesa agitadora.....	25
3.4 Métodos analíticos	
3.4.1 Processamento das amostras.....	25
3.4.2 Avaliação da produção de Ramnolipídios.....	25
3.4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada	25
3.4.2.2 Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC	26
3.4.2.2.1 Derivatização	26
3.4.2.2.2 HPLC	26
3.4.3 Determinação da biomassa microbiana.....	27
3.4.4 Determinação do óleo residual.....	27
3.4.5 Determinação do consumo de glicerol.....	27
3.4.6 Determinação do consumo de melaço.....	27
3.4.7 Caracterização físico-química dos ramnolipídios.....	28
3.4.7.1 Produção de ramnolipídios para análise.....	28
3.4.7.2 Extração de Ramnolipídios	28

3.4.7.3 Determinação da tensão superficial.....	28
3.4.7.4 Determinação da tensão interfacial.....	28
3.4.7.5 Concentração Micelar Crítica (CMC).....	29
3.4.7.6 Estabilidade de emulsão.....	29
3.4.8 Análise estatística	29
 4 RESULTADO FINAL E DISCUSSÃO	
4.1 Produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 selvagem em fontes hidrofóbicas.....	30
4.2 Produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ rhIYZ em fontes hidrofóbicas.....	34
4.3 Produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 selvagem em fontes hidrofílicas.....	39
4.4 Produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ rhIYZ em fontes hidrofílicas.....	43
4.5 Propriedades da Solução de Ramnolipídios	
4.5.1 Tensão Superficial e Interfacial.....	47
4.5.2 Concentração Micelar Crítica (CMC).....	48
4.5.3 Estabilidade de emulsão.....	53
4.5.3.1 Óleo de Soja.....	53
4.5.3.2 Benzeno.....	57
 5 CONCLUSÕES.....	61
 6 REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, permitindo sua dispersão em diferentes fases, como óleo e água, isso ocorre devido sua cadeia hidrofóbica e sua cabeça hidrofílica. Sua principal propriedade consiste em reduzir as tensões superficiais e interfaciais. (MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes, por sua vez, são metabólitos sintetizados por diversos micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Para a produção desses metabólitos microbianos pode-se empregar o cultivo em condições aeróbicas em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou mistura destes (DESAI; BANAT, 1997).

Os biossurfactantes possuem as mesmas propriedades de um surfactante químico, porém apresentam vantagens frente a eles, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, estabilidade térmica e química em amplas faixas de pH e, principalmente, produção a partir de fontes renováveis (BANAT *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2007; LOVAGLIO *et al.*, 2010); diferente do surfactante químico que a produção têm sua origem na petroquímica (DESAI; BANAT, 1997).

As propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas da biomolécula garantem sua distribuição na interface de fases fluídas em diferentes graus de polaridade. Tais propriedades possibilitam uma grande diversidade de aplicações industriais, como emulsificação, solubilização, dispersão de fases, detergência, em produtos farmacêuticos, biorremediação, síntese de nanopartículas, recuperação terciária de petróleo e outros; além dessas moléculas serem ambientalmente amigáveis (BANAT *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2007; PALANISAMY; RAICHUR, 2009; GANESH *et al.*, 2010).

Apesar de serem próximos quimicamente, os biossurfactantes também apresentam uma grande diversidade estrutural se comparado aos surfactantes químicos, como por exemplo: glicolipídeos, lipopeptídios, ácidos graxos, complexos de proteínas e polissacarídeos, lipossacarídeos e biossurfactantes poliméricos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Ainda não está claro a função biológica dos biossurfactantes para o micro-organismo produtor, mas já foram atribuídas várias proposições, como o

favorecimento na colonização de nichos ecológicos em ambientes contaminados por hidrocarbonetos ou bastante oligotrófico; podendo atuar ainda como agente antimicrobiano, permitindo a eliminação de competidores (SOBERÓN-CHAVEZ *et al.*, 2012).

Outra hipótese seria de que os ramnolipídios, no caso da *Pseudomonas aeruginosa*, auxiliam na solubilização de moléculas sinalizadoras (PQS). Esse sinalizador é pouco solúvel em ambientes aquosos, tendo suas funções comprometidas, porém quando o biossurfactante é secretado ele se torna solúvel, aumentando sua dispersão e consequentemente a bioatividade (CALFEE *et al.*, 2005).

1.2 Classificação e estrutura dos biossurfactantes

Os surfactantes químicos são classificados com base em seu grupo polar, enquanto os biossurfactantes são classificados pelo seu grupo bioquímico. Os biossurfactantes também podem ser classificados por meio de sua massa molar, os de baixa massa molar (glicolipídeos, lipopeptídeos e flavolipídeos) (SMYTH *et al.*, 2010b) e de alta massa molar (polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas) (SMYTH *et al.*, 2010a). A diferença na massa molar garante diferentes propriedades a essas biomoléculas; os de baixa massa apresentam maior atividade superficial, enquanto os de alta massa exercem melhor atividade de emulsificação (ROSENBERG; RON, 1999).

A parte hidrofóbica do biossurfactante pode apresentar um ou mais ácidos graxos, podendo ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, e a parte hidrofílica pode ter um grupo éster, hidroxil, carboxilato, fosfato ou carboidrato (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Cada espécie de micro-organismo produz uma classe diferente de biossurfactante, como a *Pseudomonas aeruginosa* que sintetiza ramnolipídios, a *Candida bombicola* que sintetiza soforolipídeos, o *Bacillus subtilis* que sintetiza a surfactina, e o *Thiobacillus thiooxidans* que sintetiza sulfolipídios (MULLIGAN, 2005; HENKEL *et al.*, 2017).

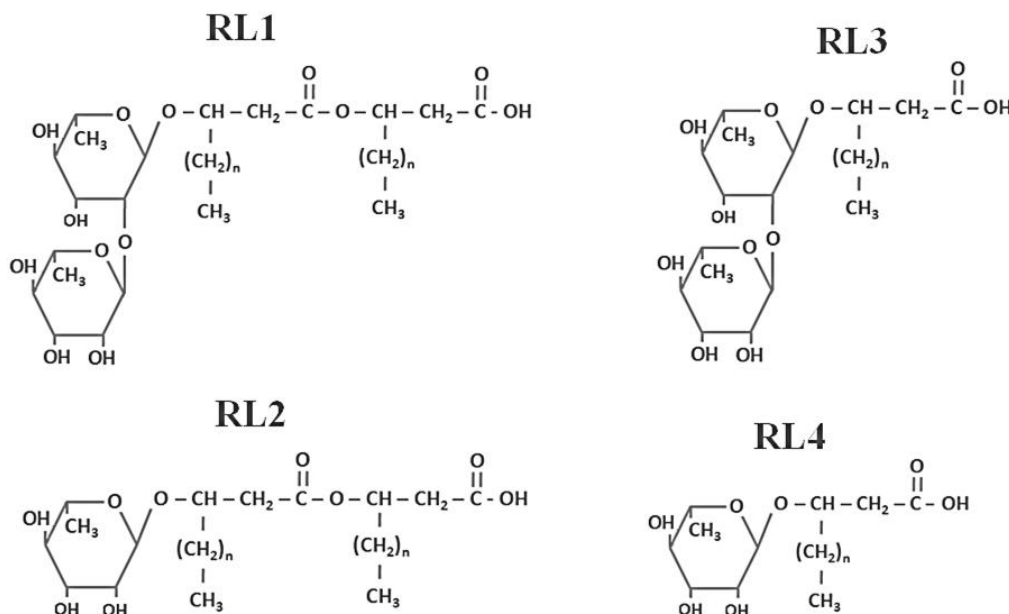
Entre os biossurfactantes, os glicolipídios são os mais pesquisados e, dentro do grupo, os ramnolipídios são os mais citados em literatura e com

solicitação de patentes; em seguida aparece o grupo dos soforolipídios (MÜLLER *et al.*, 2012; RANDHAWA; RAHMAN, 2014). Os ramnolipídios apresentam uma ou duas moléculas de ramnose na porção hidrofílica da molécula, e na região hidrofóbica, ácidos 3-hidroxiálcanóicos (JARVIS; JOHNSON, 1949).

Diversos micro-organismos podem sintetizar ramnolipídios, como *Burkholderia* (ANDRÄ *et al.*, 2006; DUBEAU *et al.*, 2009), *Enterobacter sp.* e *Pantoea sp.* (ROONEY *et al.*, 2009; VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2007), *Acinetobacter calcoaceticus* (ROONEY *et al.*, 2009), *Pseudoxanthomonas sp.* (NAYAK *et al.*, 2009), porém o principal produtor são as bactérias do gênero *Pseudomonas* (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Os ramnolipídios produzidos podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN m⁻¹ (ABALOS *et al.*, 2001) e sua concentração micelar crítica está entre 5 – 200 mgL⁻¹ (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa*, são uma mistura de congêneres, sendo que quatro são os mais conhecidos: RL1 (Rha2-C10-C10), RL2 (Rha-C10-C10), RL3 (Rha2-C10) e RL4 (Rha-C10) (LANG; WAGNER, 1987), citados na figura 1. As propriedades dos biossurfactantes dependem da composição e distribuição desses congêneres na mistura, que variam com a cepa bacteriana, condições de cultivo e composição do meio (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIECHTER, 1984). A descoberta de novos congêneres está diretamente ligada ao desenvolvimento de novos métodos analíticos, como a espectrometria de massas e a cromatografia líquida de alta precisão (LOVAGLIO, 2011b).

Figura 1: Estruturas básicas dos ramnolipídios: RL1 (2 moléculas de ramnose e 2 moléculas de ácidos graxos), RL2 (1 molécula de ramnose e 2 moléculas de ácido graxo), RL3 (2 moléculas de ramnose e 1 molécula de ácido graxo) e RL4 (1 molécula de ramnose e 1 molécula de ácido graxo).



Fonte: Yoshimura, 2019.

A principal diferença entre os congêneres produzidos pelas diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* e de outras famílias é a composição e o grau de insaturação dos ácidos graxos (DEZIEL *et al.*, 2000; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2005).

1.3 Fatores que influenciam na produção e biossíntese.

Em muitos casos, a síntese das estruturas anfipáticas deriva diretamente do metabolismo primário. As rotas para a síntese desses precursores são diversas e utilizam grupos específicos de enzimas, que podem participar da síntese, assim como atuar como reguladores (DESAI; BANAT, 1997). Segundo Sylatk e Wagner (1987), há quatro possibilidades para a biossíntese de biossurfactantes:

1. Porções hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas por duas rotas diferentes;
2. A porção hidrofílica é sintetizada, enquanto a síntese da metade

hidrofóbica é induzida pelo substrato;

3. A metade hidrofóbica é sintetizada e a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato;

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

A biossíntese de ramnolipídios por *Pseudomonas* ainda não está completamente elucidada, alguns autores relatam que, diferentes partes da molécula não são sintetizadas pelas mesmas vias (SYLDATK *et al.*, 1985) porém outros autores relatam uma produção da porção hidrofílica pela via glicolítica e a porção hidrofóbica pode ser produzida via FASII ou β -oxidação (OLVERA *et al.*, 1999; ROBERTSON *et al.*, 1994).

A produção desses biotensoativos por *P. aeruginosa* é regulada por sistemas *quorum sensing*, sendo que os dois principais sistemas são *las* e o *rhl* (GAMBELLO *et al.*, 1993; PEARSON *et al.*, 1994). O gene *rhlR* é responsável por codificar uma proteína denominada RhlR, que é um ativador transcricional, que regula a produção de ramnolipídios (OCHSNER *et al.*, 1994). Duan e Surette (2007) indicaram que, mesmo na ausência do sistema *las*, dependendo das condições de cultivo, o sistema *rhl* pode regular genes controlados pelo sistema *las*.

Zhu e Rock (2008) propuseram que a estereoquímica dos ácidos 3-hidroxi dos ramnolipídios correspondem a intermediários da biossíntese dos ácidos graxos e não dos intermediários da β -oxidação, indicando que a porção lipídica seria sintetizada a partir de duas unidades de carbono (FAS-II); sugeriram ainda que o substrato preferencial da enzima RhlA, responsável pela formação dos ácidos 3-hidroxiálcanóicos (AHA), é o ácido 3-hidroxi-decanoil-ACP. Os intermediários ACP do FAS-II compartilham uma configuração R do carbono quiral contendo um grupo 3-hidroxi, como 3-hidroxi-ACP, enquanto os intermediários correspondentes da β -oxidação, como os 3-hidroxi-ACP, estão na forma S.

Zhang e Ju (2012) verificaram que tanto a síntese *de novo* quanto a β -oxidação é responsável pela síntese dos precursores lipídicos dos ramnolipídios. Nesse trabalho, os autores realizaram dois tipos de experimentos: no primeiro, eles utilizaram glicose como fonte de carbono e em

outro uma mistura de glicose e ácidos graxos. Monitorando a atividade gênica, eles observaram que com a fonte de carbono hidrofóbica houve um aumento de até 4 vezes na atividade do gene *fadA* (cuja proteína participa da última etapa da β -oxidação) e de 200 a 600 vezes na expressão dos genes *rhIAB* relacionados à biossíntese de ramnolipídios. Através da análise de espectrometria de massa, determinou-se o padrão de incorporação de deutério, oriundo do ácido octadecanóico d35, observando-se que o congênere RhaC10 continha de 1 a 15 átomos de deutério em sua molécula, comprovando que tanto a síntese *de novo* como a β -oxidação fornecem precursores para a síntese de ramnolipídios.

Ainda, Zhang e Ju (2012) sugeriram que os intermediários da β -oxidação, que apresentam 8 carbonos, sofrem um alongamento pelo FAS-II para o intermediário de 10 carbonos, que então é entregue para a biossíntese do biossurfactante. E no estudo de Hori *et al.* (2011) a *P. aeruginosa* foi alimentada com ácidos graxos ímpares e observou-se cadeias ímpares de ramnolipídios.

Abdel-Mawgoud *et al.*, (2014) relataram que a β -oxidação é a fonte predominante do ácido 3-hidroxiacilcanóico (3-AHA), principal precursor da parte lipídica dos ramnolipídios, e que a produção de ramnolipídios diminui quando há inibição dessa via, mesmo em fontes hidrofílicas.

Os lipídios seriam entregues a via FAS-II para a produção de metabólitos primários, como estruturas celulares, enquanto a β -oxidação forneceria os precursores lipídicos destinados a metabólitos secundários, como os ramnolipídios. As fontes de carbono hidrofóbicas produziram mais ramnolipídios do que as hidrofílicas, devido os ácidos graxos desses meios serem incorporados diretamente na β -oxidação, enquanto que dos meios hidrofílicos exigiram uma síntese metabólica *de novo* para serem incorporados (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011), o que corrobora com o estudo de Burger *et al.* (1963) que concluiu que os ácidos graxos são precursores diretos dos ácidos alcanóicos.

Os intermediários da β -oxidação, como trans-2-enoil-CoA, 3-hidroxiacil-CoA, e 3-cetoacil-CoA, podem ser convertidas através de enoil-CoA hidratase, epimerase, e 3-cetoacil-CoA redutase, em ácidos graxos 3-hidroxi. Buscando

os genes que codificam essas enzimas no genoma da *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (WINSOR *et al.*, 2011), foram encontrados 14 loci para enoil-CoA hidratase, enquanto que para epimerase e 3-cetoacil-CoA redutase não foram encontrados nenhum. De 12 loci testados, três enzimas foram associadas a notáveis reduções na produção de ramnolipídios, em 35%, 56% e 54%, respectivamente, e foram nomeados de RhIK, RhIY e RhIZ (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2014).

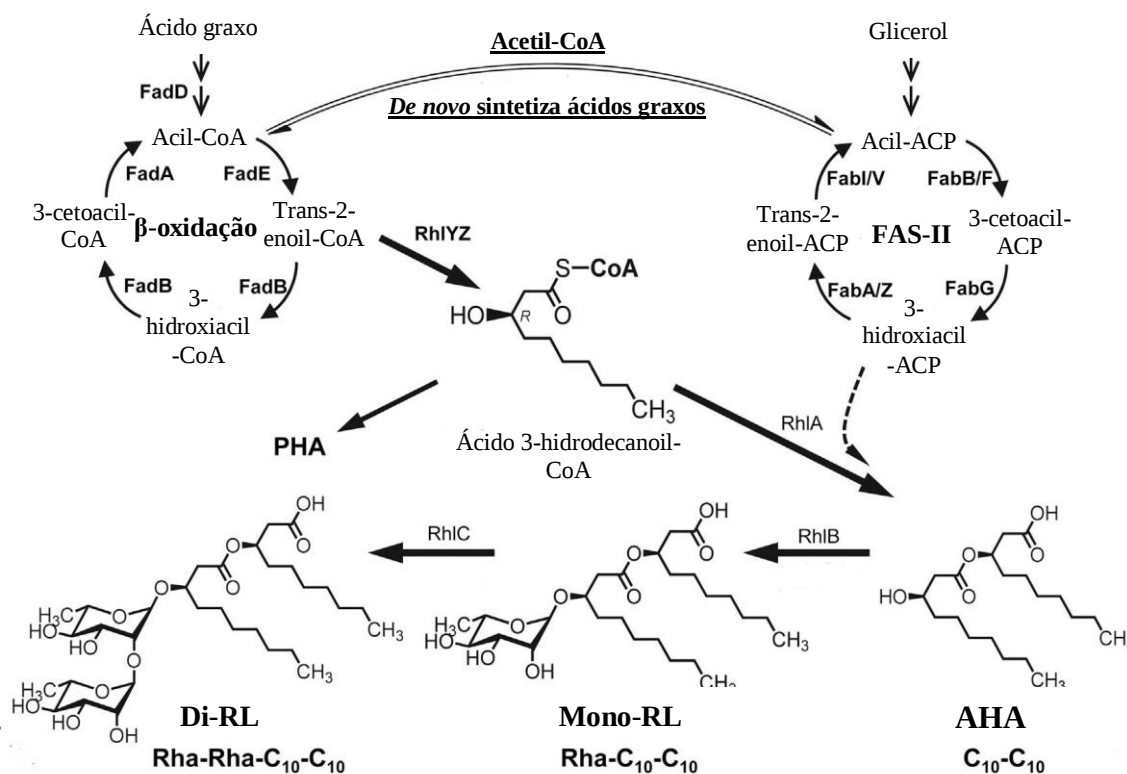
Os genes *rhIY* e *rhIZ* estão localizados no mesmo operon (WINSOR *et al.*, 2011). A deleção desses genes causou uma diminuição drástica nos precursores de ramnolipídios (70%), principalmente de 3-OH-C10, seguido dos precursores de 8 e 12 carbonos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2014), esse fato se deve as cadeias de C10 serem mais abundantes que as demais (DÉZIEL *et al.*, 2000). Observou-se também que a ação dos genes *rhIYZ* catalisam a trans-2-enoil-CoA para formação de ácido 3-hidrodecanoil-CoA.

Silva (2018) estudou o efeito da deleção dos genes *rhIYZ* na *P. aeruginosa* MPAO1, usando óleo de girassol e glicerol como fonte de carbono. Usando fonte hidrofóbica, a produção de ramnolipídios com a cepa Δ *rhIYZ* foi 38,35 % inferior a produção quando do uso da cepa selvagem MPAO1, enquanto que no experimento com a fonte hidrofílica não houve diferença expressiva entre as cepas, contrariando o observado por Abdel-Mawgoud *et al.*, (2014), porém houve um atraso na produção do biossurfactante, e o consumo da fonte foi mais acentuado também.

O ácido 3-hidroalcanoato é um precursor tanto dos ramnolipídios quanto do poli-hidroalcanoatos (PHA) (MADISON; HUISMAN, 1999; WANG *et al.*, 2012). Abdel-Mawgoud *et al.* (2014) deletaram a maioria dos genes do PHA e observaram aumento de 13% na produção de ramnolipídios, indicando que a produção de PHA causa um desvio na produção do biotensioativo. Eles observaram também um aumento notável nos congêneres RL2 (Rha-C10-C10) e uma diminuição dos RL1 (Rha-Rha-C10-C10), demonstrando que o acúmulo de precursores lipídicos junto com um conjunto limitado de ramnose favorecia os congêneres contendo uma ramnose do que aqueles com duas. A deleção do gene *rhIYZ* também causou uma diminuição de 25% na produção de PHA, confirmando que a rota do PHA também faz uso do ácido 3-hidrodecanoil-CoA.

A enzima RhlA dimeriza os ácidos graxos 3-hidroxi formando ácidos 3-hidroxiálcanóicos (AHA), precursor dos ramnolipídios, sendo o mais abundante o C10 – C10. A homologia de RhlA com transacilases, como a PhaG envolvida na síntese de poli-hidroxiálcanoatos (PHA), levou a proposição de que RhlA é uma transacilase que catalisa a transferência do ácido 3-hidrodecanoil associado à proteína carreadora de acila (ACP) para a coenzima A (CoA). (DÉZIEL *et al.*, 2003; ZHU; ROCK, 2008). Enquanto as enzimas RhlB e RhlC são responsáveis por acrescentar a molécula de ramnose, sendo a enzima RhlB formadora do congênere RL2 (Rha-C10-C10), e a enzima RhlC do congênere RL1 (Rha-Rha-C10-C10) a partir do congênere mono (OCHSNER *et al.*, 1994; RAHIM *et al.*, 2001). O esquema representando os genes da biossíntese de ramnolipídios e das rotas metabólicas envolvidas, podem ser observadas na figura 2.

Figura 2: Modelo proposto para suprimento metabólico de precursores lipídicos de ramnolipídios. Na β -oxidação ocorre um encurtamento da cadeia de ácido graxo até a formação do intermediário trans-2-enoil-CoA. Enquanto que, no caso do glicerol, a síntese *de novo* via FAS-II forma ácidos graxos que são desviados para a β -oxidação.



Fonte: modificado de Abdel-Mawgoud *et al.* (2014).

Lovaglio *et al.* (2015) afirma que, quando o carbono hidrofílico (cadeia curta) é empregado como fonte, é mais energeticamente favorável fazer a porção hidrofóbica pela síntese *de novo*, pois seria oxidado em acetil-CoA, que passaria para malonil-CoA, e em seguida para malonil-ACP, começando o ciclo FAS II. Entretanto, se a fonte de carbono proporcionar ácidos graxos de cadeia longa, é mais favorável que a porção lipídica seja sintetizada na rota da β -oxidação, não exigindo a oxidação completa do acetil-CoA para ir para o ciclo FAS II, desviando-a para formação de glicolípido.

A ramnose pode ser obtida pela conversão da glicose, através da enzima fosfoglicomutase AlgC, convertendo D-glicose-6-fosfato em D-glicose-1-fosfato, que é utilizado por outras enzimas produzindo, ao final do processo bioquímico, dTDP-Lramnose. A ramnose também pode ser obtida através da oxidação de lipídios através do ciclo do glioxilato, onde acetil-CoA, formada na β -oxidação, é convertida à succinato, que é transformado em malato no ciclo do ácido cítrico. O malato é oxidado à oxaloacetato que pela gliconeogênese é convertido em hexoses, e posteriormente à ramnose (OLVERA *et al.*, 1999; ROBERTSON *et al.*, 1994).

1.3.1 Produção de biossurfactante

A produção de biossurfactante é influenciada por diversos fatores, tais como: pH, limitações nutricionais, aeração, agitação, formação de espuma, temperatura e fonte de carbono; que afetam o tipo e a quantidade de biotensoativo produzido (FIECHTER, 1992; CHANG *et al.*, 2005).

A temperatura ótima, no caso da *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, é de 37°C (Robert *et al.*, 1989); e a melhor faixa de pH é entre 6,0 e 6,5, enquanto que no pH 7,0 a produção cai bruscamente (GUERRA-SANTOS; KÄPPELI; FIECHTER, 1984). Outro parâmetro importante é o oxigênio disponível no meio de cultura, como foi demonstrado por Sheppard e Cooper (1990) em seu estudo acerca da produção de surfactina por *B. subtilis*.

Os compostos nitrogenados são um dos componentes nutricionais que mais afetam a produção de ramnolipídios, podendo induzir ou inibir. O uso de cátions bivalentes demonstrou ser inibitório na produção (GUERRA-SANTOS;

KÄPPELI; FIECHTER, 1986; RAMANA; KARANTH, 1989), e o uso de amônio (NH^+4), glutamina, asparagina e arginina, diminuíram a produção, porém outras fontes de nitrogênio como nitrato (NO^{-3}), glutamato e aspartato ajudaram na produção (MULLIGAN; GIBBS, 1989; RAMANA; KARANTH, 1989; KÖHLER *et al.*, 2000). O nitrato é relatado como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios, pois estimula a expressão do gene *rhIAB*, um dos principais responsáveis pela síntese desse bioproduto (VENKATA; RAMANA, KARANTH, 1989; MANRESA *et al.*, 1991; ARINO *et al.*, 1996).

A proporção C/N também demonstrou ser um fator crucial na produção de ramnolipídios, como relata o estudo de Benincasa e Accorsini (2008), que avaliaram a produção por *Pseudomonas aeruginosa* LBI em diferentes proporções, alcançando a melhor produção quando a proporção foi de 8/1, enquanto Lovaglio (2010) alcançou o melhor rendimento em 23/1.

A produção de biossurfactante em biorreator enfrenta um problema que é a formação de espuma com presença de biotensioativo de interesse, junto com células e nutrientes, impossibilitando o descarte do excesso de espuma. Nesse caso ocorre a interrupção da fermentação antes do período estabelecido, acarretando em um menor rendimento (SILVA, 2011).

Uma das maiores dificuldades na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* consiste no fato dela ser um patógeno oportunista, apresentando grande resistência à antimicrobianos (TREEPONG; KOS, GUYEUX, 2017), o que aumenta os custos do bioprocesso, pois exige uma infraestrutura mais segura. Zulianello *et al.* (2006) relatam que o ramnolipídio pode ser considerado um fator de virulência, devido ele ajudar as bactérias *P. aeruginosa* a romper células epiteliais humanas durante o início da infecção de paciente com fibrose cística.

1.3.2 Substratos alternativos

A natureza da fonte de carbono é um dos fatores mais relevantes na distribuição de congêneres quando se trata da composição do meio. Na cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi observado a predominância do congênere RL2 (RhaC10C10) nas fontes hidrofóbicas, enquanto que nas fontes hidrofílicas predominou o congênere RL1 (Rha2C10C10) (NITSCHKE *et al.*,

2005). Na cepa UG2, os substratos hidrofóbicos geraram quantidades maiores de ramnolipídios do que os substratos hidrofílicos (MATA-SANDOVAL; KARNIS; TPRRENTS, 2001).

A utilização de fontes de carbono alternativas contribui para redução da poluição ambiental, e agrega valor aos mesmos, uma vez que cerca de 10 – 30% do custo de produção de um produto biotecnológico é referente à matéria-prima utilizada (MUKHERJEE *et al.*, 2006). O uso de fontes alternativas também possibilita o descobrimento de novos tipos de congêneres, como foi o caso de Benincasa *et al.*, (2004) que caracterizaram, e testaram a eficiência antimicrobiana, de um novo congênere de ramnolipídio proporcionado pelo cultivo em borra de óleo de girassol.

Nitschke *et al.*, (2005) avaliaram a produção de ramnolipídios por meio de 5 fontes diferentes: glicose, glicerol, óleo de soja, borra de óleo de soja e gordura de galinha. O melhor resultado foi obtido com borra de óleo de soja, atingindo uma produção de 11,72 g L⁻¹. A biomassa produzida em todas as fontes foi parecida: a menor apresentando 1,39 mg/mL (gordura de galinha) e a maior 1,75 mg/mL (óleo de soja). Um dado interessante é que o glicerol, uma fonte hidrofílica, apresentou maior produção do biotensioativo do que duas fontes hidrofóbicas, com uma concentração de 8,05 g L⁻¹, enquanto que, a gordura de galinha e o óleo de soja, produziram 6,8 gL⁻¹ e 7,63 gL⁻¹ respectivamente.

O óleo de fritura é um resíduo alternativo promissor, devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade. O óleo de fritura tem como base o uso de outros tipos de óleos, podendo ser de origem vegetal ou animal. Ele é composto por triacilgliceróis, água, ácidos graxos livres, compostos polares e compostos não voláteis (VIEITEZ *et al.*, 2014), e a reutilização do mesmo óleo pode agravar três aspectos: umidade, oxigenação e aceleração do processo de oxidação e hidrólise (RUIZ-MÉNDEZ *et al.*, 2008). Kock *et al.* (1996) afirma que depois que o óleo é usado, pode aumentar em até 30% a quantidade de compostos polares, dependendo da maneira como é usado, do número de ciclos e do alimento utilizado.

Ceccato (2013) avaliou a produção de ramnolipídios a partir da *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em diferentes concentrações de óleo de

fritura, respectivamente: 50, 125 e 250 g L⁻¹. Observou-se que em todos os experimentos, houve a predominância de RL2 em relação ao RL1, como esperado para as fontes hidrofóbicas. A melhor produção foi observada na concentração de 250g L⁻¹, com uma concentração de 0,441g L⁻¹ de ramnolipídio total, porém, ocorria pouca variação quanto à produção em 125 g L⁻¹, que foi de 0,415 g L⁻¹ indicando que a concentração de 125 g L⁻¹ possui melhor vantagem em relação as demais concentrações. Já Haba *et al.* (2000) utilizando a mesma fonte obteve 2,7 g L⁻¹ de ramnolipídio total a partir da *P. aeruginosa* 47T2 NCIB 40044, em uma razão C/N de 8.

A indústria de óleos e gorduras produzem grandes quantidades de resíduos, provenientes da extração do óleo de alguns vegetais, como algodão, milho, soja e outros. Esses resíduos, geralmente, contêm altos níveis de carboidratos e lipídios (MERCADE; MANRESA, 1994).

No experimento de Benincasa *et al.* (2002) foi avaliado a produção de ramnolipídios a partir de óleo de azeite, óleo de soja, óleo e borra de óleo de girassol. O resíduo produziu 12 g L⁻¹ de ramnolipídios, superior a produção de azeite (5.4 g L⁻¹), óleo de soja (4.8 g L⁻¹) e até de óleo de girassol (4.9 g L⁻¹). Os autores também estudaram a composição de ácidos graxos contidos nessa fonte de carbono, e observaram a rápida diminuição do ácido linoleico no experimento, indo de 50% para 4% após as primeiras 48 horas, e do ácido oleico, indo de 25% para 0,12% ao final do experimento. No óleo de girassol, a concentração inicial de ácido linoleico era de 65-70%, enquanto que do ácido oleico era de 20-25%. Vale observar que não houve consumo do ácido esteárico.

A borra de milho é um resíduo derivado da etapa de neutralização dos ácidos graxos livres com hidróxido de sódio do óleo bruto (FRÉ, 2009), formando uma emulsão oleosa alcalina, constituída por água, ácidos graxos saponificados, triclicerídeos, fosfatídeos e outros compostos em menor concentração (PARK *et al.*, 2008). Swern (1982) afirma que a borra bruta, normalmente, apresenta de 35 a 50% de ácidos graxos totais.

No estudo de Portin *et al.* (2016) foi realizado a caracterização físico-química da borra de milho. Os resultados obtidos foram: 42,36% de umidade, o que engloba teor de água e matéria orgânica volátil; pH 7,13; 4,14% de

substâncias inorgânicas; 24 % de óleo neutro e 57% de ácidos graxos totais. Os valores de ácidos graxos totais divergem de outros estudos da mesma linha, como do Wang *et al.* (2007) e Haas (2005), onde o valor foi de 35% e 46% para ácidos graxos totais. Tal diferença é justificada pelo autor dizendo que houve diferença no método de separação borra/óleo, enquanto o estudo de Wang *et al.* (2007) e Haas (2005) a separação foi feita por centrifugação, no estudo de Portin *et al.* (2016) a separação foi por decantação.

Raza *et al.* (2006) utilizou três tipos de resíduos provenientes da produção de óleo vegetal: canola, soja e milho, para produção de ramnolipídios através da cepa mutante *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8. Além da produção, foi avaliado meios de otimização do processo usando diferentes fontes de nitrogênio, como nitrato de sódio, sulfato de amônio e nitrato de amônio, e sua razão C/N. O melhor resultado foi obtido no resíduo de óleo de canola, com uma produção de 8,5 g L⁻¹, usando nitrato de sódio em uma proporção C/N de 20. O aumento de nitrogênio proporcionou maior crescimento bacteriano, com pouca produção de biossurfactante, indicando a fase exponencial segundo os autores, e quando o suprimento de nitrogênio diminuiu, ele entrou na fase estacionária, aumentando a produção de ramnolipídios.

Lovaglio (2011a) também estudou a produção de ramnolipídios em diferentes resíduos, como borra de óleo de soja, milho e algodão, a partir de 10 mutantes randômicos obtidos a partir da *P. aeruginosa* LBI, tais linhagens apresentaram resultados superiores ao obtido pela selvagem. Para a borra de algodão, a mutante *P. aeruginosa* LBI 1C10 foi a que obteve mais destaque, com uma produção de 1,32 g L⁻¹, superior em 46% a produção da *P. aeruginosa* LBI selvagem, que produziu 0,91 g L⁻¹. Para a borra de soja, a cepa selvagem produziu 60% menos do que quando foi cultivada na borra de algodão, e a mutante 3C10 foi a que obteve mais destaque, com uma produção de 0,57 g L⁻¹. Já para a borra de milho, a bactéria não modificada produziu 0,78 g L⁻¹, maior em relação a mutante 2H5, que apresentou 0,57 g L⁻¹, e semelhante as mutantes 2B4 e 4E11, com 0,873 gL⁻¹e 0,876 gL⁻¹respectivamente; porém a mutante 1B10 produziu 39% a mais que a selvagem, com uma concentração de 1,09 g L⁻¹.

Há alguns óleos nativos como: buriti, maracujá, andiroba, castanha-do-

Brasil, e babaçu, que apresentaram bons rendimentos na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI, e que poderão conferir novos congêneres e conseqüentemente novas aplicações para estes, assim como aumentar o valor agregado desse tipo de insumo (COSTA *et al.*, 2006).

Outra fonte de carbono de grande interesse é o glicerol, pois ele é um dos principais subprodutos na produção de biodiesel. A cada tonelada de biodiesel são gerados 100kg de glicerol (MU *et al.*, 2006), o que é um problema, pois o seu descarte é dispendioso e seu valor de mercado é baixo, ocasionando grande preocupação referente ao descarte desse resíduo, e ao fato do biodiesel ser o principal substituinte dos combustíveis fósseis. A utilização do glicerol como fonte de carbono na produção de biossurfactante é uma solução para esse problema, pois reduz seu acúmulo e favorece a produção de biossurfactantes (SILVA *et al.*, 2009).

Os resíduos açucareiros também estão sendo estudados como fontes alternativas devido ao baixo custo. O melaço é o principal resíduo da indústria sucroalcooleira, produzindo cerca de 60 kg de melaço por tonelada de cana-de-açúcar moída (ALCARDE, 2009). Devido seu alto teor de açúcar, o melaço é empregado como matéria prima para fermentação alcoólica, produção de proteínas e ração animal (MEZAROBIA *et al.*, 2010; MURUAGA *et al.*, 2016). O melaço de cana-de-açúcar apresenta em sua composição: polissacarídeos, como sacarose, glicose, frutose, amido, dextrana; vitaminas e proteínas (KULPREECHA *et al.*, 2009; ARAÚJO, 2017; RAZA *et al.*, 2017).

Tan e Li (2018) em revisão sobre o assunto destacam algumas produções de ramnolipídios a partir de carboidratos, sendo os principais: o açúcar oriundo do pré-tratamento e hidrólise de palha de trigo, o qual permitiu uma produção de 9,38 gL⁻¹ de ramnolipídios pela *P. aeruginosa* NC11M 2036; polpa de cevada, resíduo de lignocelulose que produziu 9,3 gL⁻¹ pela *P. aeruginosa* ATCC 9027 e, usando a mesma cepa, mas agora utilizando polpa de avelã como fonte de carbono foi obtido 11,1 gL⁻¹ de ramnolipídio.

Existem outras fontes alternativas sendo pesquisadas para produção do biotensioativo, como soro de leite (DUBEY; JUWARKER, 2001), outros óleos vegetais (VIPULANANDAN; REN, 2002; HABA *et al.*, 2003), e ácidos graxos livres (Abalos *et al.*, 2002).

1.4 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes possuem diversas aplicações, atraindo a atenção de diversos setores da indústria, como da agroindústria, medicina, petroquímica, alimentícia e cosmética, porque além de suas propriedades funcionais, os biossurfactantes também são menos nocivos ao meio ambiente, e mantêm suas propriedades em uma ampla faixa de pH e salinidade, permitindo sua utilização na indústria sustentável (KITAMOTO *et al.*, 2002; SANDRIN *et al.*, 2000; RAHMAN *et al.*, 2003; LOVAGLIO *et al.*, 2010; MARCHANT; BANAT, 2012).

Uma das maiores áreas de aplicação dos biossurfactantes é na indústria petroquímica, onde são incorporados em formulações de óleos lubrificantes e na produção de petróleo, assim como na biorremediação, dispersão no derramamento de óleo, recuperação melhorada de petróleo, e na remoção e mobilização de resíduos de óleos em tanques (DESAI; BANAT, 1997).

Referente a aplicação do biossurfactante na área da biorremediação, foi comprovado seu uso na limpeza de ambientes aquáticos e terrestres contaminados por petróleo, petroderivados e metais pesados (BANAT *et al.*, 1995). O estudo de Costa *et al.* (2010) demonstrou o potencial dos ramnolipídios na remoção de petróleo bruto em areias contaminadas.

Piróllo *et al.* (2008) avaliou a estabilidade e emulsificação dos ramnolipídios produzidos pela *P. aeruginosa* LBI em diversas simulações de contaminação por hidrocarbonetos, como benzeno, tolueno, querosene, óleo diesel e petróleo bruto. Não houve produção de biotenssoativo em meio de tolueno e benzeno. A melhor produção foi em óleo diesel, com uma concentração de 9,9 gL⁻¹ de ramnolipídios. Todos os meios apresentaram altas concentrações de emulsificação e de superfície de tensão, indicando que os ramnolipídios podem ser usados na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos.

Venkatesh e Vedaraman (2012) demonstraram que uma solução contendo 2% de ramnolipídios é capaz de remover 74% do cobre contido em solo contaminado. Enquanto o estudo de Wang e Mulligan (2009) relataram sua eficiência na remoção de arsênio de rejeitos da mineração.

Zhang *et al.* (2017) adicionou 2mg g⁻¹ de ramnolipídios às lamas oleosas

desidratadas para acelerar a degradação anaeróbica da biomassa, e observou a remoção de contaminantes orgânicos e a aceleração da hidrólise e da fermentação das lamas de óleo, resultando em um aumento na matéria orgânica solúvel, gerando enriquecimento dos micro-organismos participantes do ciclo do sulfato/sulfeto, sendo bastante promissor para um sistema bioeletroquímico.

Os ramnolipídios foram capazes de reduzir a adsorção de células *P. aeruginosa* ATCC 9027 em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, a partir da baixa concentração de mono-ramnolipídio, indicando que o biotensoativo afetou a hidrofobicidade da superfície celular, mesmo em concentração inferior a 100 mgL⁻¹ de ramnolipídio (ZHONG *et al.*, 2015).

Na medicina, os ramnolipídios podem desempenhar diversas funções, como agente antimicrobiano, sendo efetivo em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, e em fungos filamentosos, porém ele não apresenta papel significativo contra leveduras (VATSA *et al.*, 2010).

Os biossurfactantes possuem a propriedade de remover e impedir a formação de biofilmes patogênicos, como em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções internas (SINGH; CAMEOTRA, 2004; SANTOS; DRUMMOND, DIAS-SOUZA, 2017), e em materiais na indústria de alimentos. Quando aplicado surfactina e ramnolipídio na superfície de materiais, ocorre a alteração de suas propriedades externas, dificultando a formação de biofilmes gerados por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* (GOMES; NITSCHKE, 2012).

Ainda na área da saúde, os ramnolipídios vêm sendo aplicados como cicatrizantes de úlcera e queimaduras (PILJAC *et al.*, 2008; STIPCEVIC *et al.*, 2006). E podem também provocar uma resposta positiva no sistema imunológico inato de células humanas e de animais, funcionando como ativador, tal característica somada às propriedades antimicrobiana desse biotensoativo, pode levar a uma aplicação terapêutica em pacientes imunodeprimidos, a fim de combater infecções (VATSA *et al.*, 2010). Além disso, alguns biossurfactantes como a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformes*, e os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* podem ser utilizados como antibióticos (MAKKAR; CAMEOTRA.,

2002).

Outra aplicação dos biotensoativos é como inseticida biológico, não se restringindo apenas na área rural. O estudo de Kim *et al.* (2011) utilizou os congêneres de di-ramnolipídios C32H58O13 e C34H62O13 contra os pulgões da espécie *Myzus persicae*, demonstrando a eliminação de 100% da população quando a concentração foi de 100 µg/mL.

Em 2015 foi estudado a ação dos ramnolipídios frente a mosquitos vetores de dengue, chikungunya, febre amarela e malária, realizado Prabakaran *et al.* (2015) que descreveram a atividade de di-ramnolipídios em pupas dos mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*, apresentando concentração letal média (LC50) de 0,003mg/100mL de di-ramnolipídios. Estudo realizado por Silva *et al.* (2015) avaliou o potencial inseticida, larvicida e a atividade de repelência desses biossurfactantes contra mosquitos *Aedes aegypti*, sendo que as concentrações de 800, 900 e 1000 mgL⁻¹ de ramnolipídios eliminaram todas as larvas do mosquito em 18 horas, e houve a eliminação total dos adultos em 1000mg L⁻¹.

Os ramnolipídios apresentam enorme diversidade de aplicações na área da agroindústria, devido diversas propriedades, como sua atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, possuindo potencial para o controle biológico de fito-patógenos que produzem zoósporos (ABALOS *et al.*, 2001).

As classes de biossurfactantes, sorolipídios e ramnolipídios, foram usados para combater os fungos causadores da perda de rigidez e de manchas cinzas em tomates e maçãs (KIM *et al.*, 2000). Os ramnolipídios já demonstraram serem eficaz na proteção de videiras contra ataques de *Botrytis cinérea* (VARNIER *et al.*, 2009), e também no controle da incidência de fungos da espécie *Colletotrichum falcatum*, principal fungo causador da doença “red hot” na cana de açúcar, que causa grande perda no cultivo em diversos países (GOSWAMI *et al.*, 2015). Os ramnolipídios também são eficientes no controle de muitos outros tipos de fungos patogênicos de plantas, como *Botrytis sp*, *Rhizoctonia sp*, *Pythium sp*, *Phytophthora sp*, e *Plasmopara sp* (VATSA *et al.*, 2010); reforçando ainda mais sua característica antifúngica.

Os ramnolipídios podem ser usados como fungicida tanto na forma pura como misturado ao caldo fermentado livre de células, levando o barateamento

do produto não purificado, tornando-o mais competitivo em relação aos antifúngicos comerciais (SHA *et al.*, 2012).

Na área alimentícia, quando empregados, eles podem atuar como controladores de consistência, solubilizadores de sabor, e na conservação de produtos da panificação (NITSCHKE *et al.*, 2011), ou ainda no combate a adesão de alguns micro-organismos, como *Listeria monocytogenes* (Gram-positivo) e *Pseudomonas fluorescens* (Gram-negativo), em superfícies de poliestireno e aço inoxidável, sendo que no poliestireno houve redução da adesão em 79%, e no aço inoxidável de 83% (ARAUJO *et al.*, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a produção de ramnolipídios utilizando as cepas *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 e *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhIYZ$ (SILVA, 2018) frente a diferentes fontes de carbono proporcionados pela agroindústria.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar quais as melhores fontes de carbono oriundas da agroindústria, como óleo de fritura, borra de óleo de algodão, borra de óleo de milho, glicerol bruto, glicerol bidestilado e melaço; para produção de ramnolipídios por meio da cepa *P. aeruginosa* MPAO1 e da mutante *P. aeruginosa* $\Delta rhIYZ$.
- Inferir acerca da função do operon *rhIYZ* e sua influência na produção dos biotensoativos nas diferentes fontes de carbono avaliadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo

Os micro-organismos utilizados no presente estudo foram *P. aeruginosa* MPAO1 e a mutante, *P. aeruginosa* Δ rhIYZ (SILVA, 2018) que estão acondicionados a -20 °C e são provenientes do Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp, Campus Rio Claro.

3.2 Meio de cultura

3.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato

O meio de cultura utilizado para preparo do inóculo possuía a seguinte constituição em (g L⁻¹): MgSO₄ 7H₂O - 0,05; KCl - 0,1; NaNO₃ - 1,5; fonte de carbono - 125; tampão fosfato 0,1M pH 6,5 e 1 mL/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g L⁻¹): citrato de sódio dihidratado - 2,0; FeCl₃ 6H₂O - 0,28; ZnSO₄ 7H₂O - 1,4; CoCl₂ 6H₂O - 1,2; CuSO₄ 5H₂O - 1,2; MnSO₄ H₂O - 0,8. Como fonte de carbono foi usado óleo de girassol.

4.2.2 Meio Mineral livre de cálcio

Para a produção de ramnolipídios foi utilizado o seguinte meio (g L⁻¹): K₂HPO₄ - 0,3; MgSO₄ 7H₂O - 0,5; KCl - 1,0; NaNO₃ - 15; e a fonte de carbono - 100.

As fontes de carbono utilizadas na composição do meio foram: borra de óleo de milho, borra de óleo de algodão, óleo de fritura, glicerol bruto, glicerol bidestilado e melaço. O óleo de fritura foi obtido no restaurante universitário da Unesp de Rio Claro; a borra de algodão pela empresa óleos Menu Indústria e Comércio Ltda (Guararapes/SP); a borra de milho pela Cargill S.A (Brasil); o glicerol bruto e bidestilado pela Biocapital Participações S.A (Charqueada/SP) e o melaço pela Usina São Domingos S.A (Catanduva/SP).

3.3 Condições de cultivo

3.3.1 Preparo do Inóculo

O micro-organismo foi pré-cultivado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de caldo lisogênico e 100 µL da cultura estoque do micro-

organismo, a incubação foi feita em mesa agitadora, durante 24 horas à 30°C e 200 rpm. Em seguida 1,25 mL desse pré-cultivo foi transferido para frascos de 500 mL com 100 mL de Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato e o frasco incubado por 24 horas à 30°C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada posteriormente para inoculação da fase aquosa do meio de cultura resultando em uma densidade ótica (D.O 580 nm) de modo que, o meio de cultura inoculado fique a 0,1.

3.3.2 Bioprocessos em mesa agitadora

Os bioprocessos realizados a fim de verificar a produção de ramnolipídios foram executados em mesa agitadora tipo shaker, a 37 °C sob agitação de 200 rpm, por um período de 144 horas, com injeção de elementos traços nos períodos de 0, 20, 40 ,70 e 120 (item 3.2.1) horas de cultivo. Amostras de 5mL foram retiradas a cada 24h para avaliação do perfil de produção de ramnolipídios, os meios de cultura utilizado foi o meio mineral livre de cálcio, tendo por fonte de carbono os resíduos acima (item 3.2.2).

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Processamento das amostras

A cada amostra foi adicionado n-hexano no volume 1:1, seguido de agitação das amostras por 1 minuto e posteriormente essas amostras foram centrifugadas à 10000 rpm, 4°C por 10 minutos para que ocorra a separação de fases células / fase aquosa / n-hexano.

3.4.2 Avaliação da produção de Ramnolipídios

3.4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar a produção de ramnolipídios antes de prosseguir para as análises em HPLC e foram realizadas de acordo com a metodologia utilizada por Lovaglio (2011a). Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte mistura, em volume: clorofórmio / metanol / ácido acético (65:15:2). O agente revelador utilizado foi composto da mistura 2 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico. As amostras

consistindo de 10 µL de extratos de ramnolipídios obtidos a partir do caldo livre de células, em diferentes tempos de fermentação.

3.4.2.2 Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC

3.4.2.2.1 Derivatização

Para a análise em HPLC as amostras e os padrões contendo ramnolipídios foram derivatizadas de acordo com o descrito por Schenk *et al.* (1995) com pequenas modificações, a fim de serem detectadas via detector de UV.

As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360 µL de acetonitrila e 40 µL da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40mM e Trietilamina 20mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um termomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf AG).

3.4.2.2.2 HPLC

As análises foram realizadas em equipamento HPLC (Shimatzu) acoplado a um detector UV como descrito por (MÜLLER *et al.*, 2010). Para a calibração do HPLC foi utilizado solução padrão de mono- e di-ramnolipídio (Sigma Aldrich), derivatizadas, nas seguintes concentrações: 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g L⁻¹. 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 móveis foram: solução A com 5% de metanol e Solução B com 95%, ambas em água ultrapura. Para que ocorra separação dos congêneres presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 a 100% da solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da solução B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida ocorreu um decréscimo para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que ocorra equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios serão monitorados à 254 nm. Os tempos de retenção foram 22,3 – 22,5 min pra Rha-Rha-C10 e 23,2 – 23,4 min para Rha-Rha-C10C10.

3.4.3 Determinação da biomassa microbiana

Após a separação das 3 fases (item 3.4.1) o *pellet* de células foi re-suspenso em NaCl 0,85% (v/v) (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 10000 rpm, 4°C por 10 minutos. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantido em estufa à 100°C até atingir peso constante. A análise foi gravimétrica por massa seca celular, e posteriormente convertida em gL⁻¹.

3.4.4 Determinação do óleo residual

A fase de n-hexano, obtida como descrito no item 3.4.1, foi usada para determinação gravimétrica das concentrações de óleo, depois da evaporação do solvente (LOVAGLIO, 2011).

3.4.5 Determinação do consumo de glicerol

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

3.4.6 Determinação de melaço

O melaço foi determinado como descrito por Nogueira (2019), através das concentrações de açúcares totais, as quais foram obtidas por meio da soma das concentrações de sacarose, glicose e frutose. As determinações de glicose, frutose e sacarose foram realizadas a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu®, Japão), acoplado aos detectores ultravioleta (SPD- 20A UV/Vis®) e índice de refração (RID-10A®), equipado com a coluna Rezex RCM – Monossacarídeo Ca²⁺ (8%) (300 x 7,8 mm) (Phenomenex®, EUA). As condições de análise foram: volume de injeção(20µL); temperatura da coluna (65°C); e eluente (água ultrapura) a uma vazão de 0,6 mL/min. Para cada experimento, o consumo de açúcares totais (gL⁻¹) foi calculado pela diferença

entre a quantidade inicial e final de açúcares totais.

3.4.7 Caracterização físico-química dos ramnolipídios

3.4.7.1 Produção de ramnolipídios para análise

As fermentações para produção de ramnolipídios foram conduzidas em Erlenmeyers de 1 litro seguindo os padrões dos itens 3.2.1, 3.2.2, 3.3.1 e 3.3.1. As fontes de carbono escolhido foram os que obtiveram melhores produções, como óleo de fritura, borra de algodão e borra de milho. O micro-organismo utilizado foi *P. aeruginosa* MPAO1 e sua mutante, MPAO1 $\Delta rhlYZ$.

3.4.7.2 Extração de Ramnolipídios

Um volume do caldo livre de células foi misturado ao mesmo volume de n-hexano (1:1), agitou-se vigorosamente até completa homogeneização. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso, até que houvesse a separação das fases. Descartou-se a fase contendo n-hexano/ óleo e adicionou-se H₃PO₄ 85% 1:100 (v/v) à fase aquosa, levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do biotensoativo utilizou-se acetato de etila 1:1, 25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em rotavapor e obtenção do ramnolipídio. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

3.4.7.3 Determinação da tensão superficial

Foi medido, em triplicata, a tensão superficial de soluções 0,1% (p/v) de ramnolipídios, segundo o método do anel de De Nöuy utilizando-se um tensiômetro Krüss K6.

3.4.7.4 Tensão Interfacial

Foi mensurada a tensão interfacial entre solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios e hexadecano, utilizando-se o tensiômetro Krüss K6. As análises foram conduzidas em triplicatas.

3.4.7.5 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) foi determinada medindo-se a tensão superficial de soluções de ramnolipídios. As soluções foram preparadas em água ultra puras nas seguintes concentrações: 1,0; 10; 20; 30; 40; 50; 100, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹. A leitura da tensão superficial de cada solução foi realizada por meio de um tensiômetro Krüss K6. As análises foram conduzidas em triplicata.

3.4.7.6 Estabilidade de emulsão

Foi avaliada a estabilidade de emulsões formadas por soluções de biossurfactante e surfactante químico (Dodecil Sulfato de Sódio – SDS), com diferentes valores de pH (2,0 à 9,0), contra óleo de soja e benzeno. Para ajuste do pH utilizou-se HCl (0,1M) e NaOH (0,1M). As análises foram realizadas em temperatura ambiente. O Índice de emulsificação foi determinado, segundo Iqbal *et. al.* (1995), por intermédio da adição do hidrocarboneto a ser avaliado à solução 0,1 % (p/v) de ramnolipídios (2mL de cada), em tubos de ensaio seguidos por agitação em alta velocidade em vórtex durante 2 minutos. As leituras foram realizadas a cada 10 minutos, por um período de 60 minutos e também após 24 horas de repouso. O índice de emulsificação foi calculado por meio da fórmula:

$$AE = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$$

3.4.8 Análise estatística.

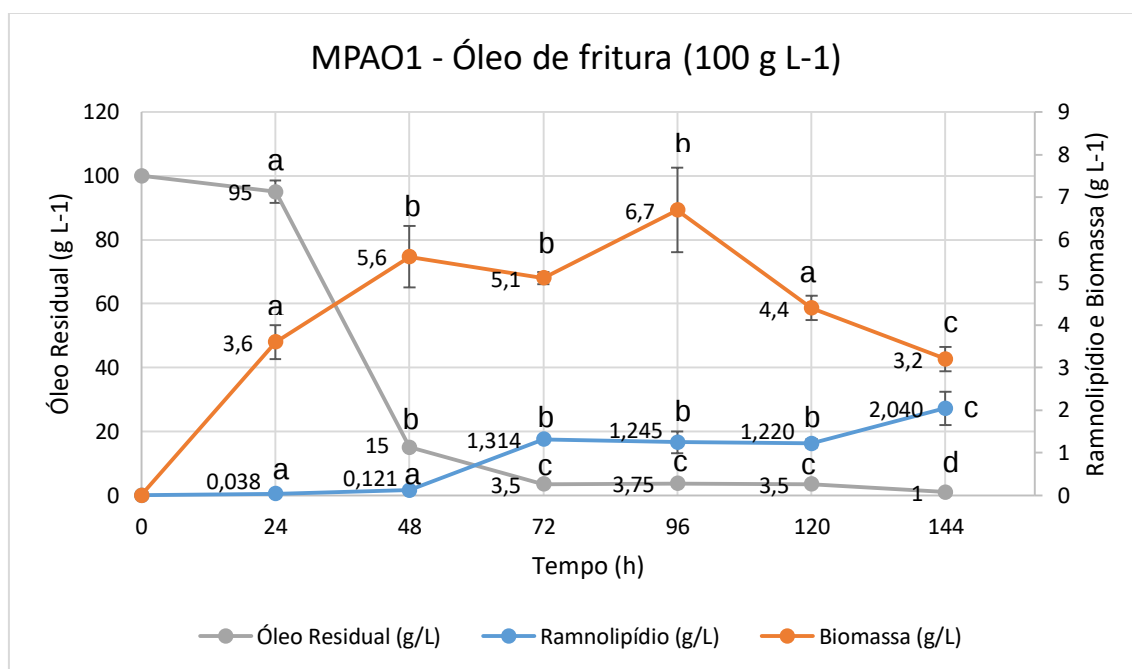
Os dados foram comparados utilizando análise de variância, as diferenças significativas se deram com $p < 0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1995).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* MPAO1 selvagem em fontes hidrofóbicas

Os resultados obtidos dos experimentos com a MPAO1 utilizando óleo de fritura pode ser observado na figura 3; da borra de algodão na figura 4; e da borra de milho na figura 5. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 3 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de fritura como fonte de carbono para cepa selvagem MPAO1. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Observou-se que até 48h, a produção de ramnolipídios foi baixa, uma vez que ocorria o crescimento exponencial da biomassa, ao mesmo tempo em que um alto consumo de óleo é observado. De 24 para 48h, foi quando houve o maior consumo, com uma queda de 95 g L⁻¹ para 15 g L⁻¹, e isso não implicou em um aumento significativo na produção de ramnolipídio, indicando que o consumo favorecia o crescimento, assim como a produção de outros metabolitos pela bactéria.

Entre 48 horas e 96 horas observa-se um platô na formação da

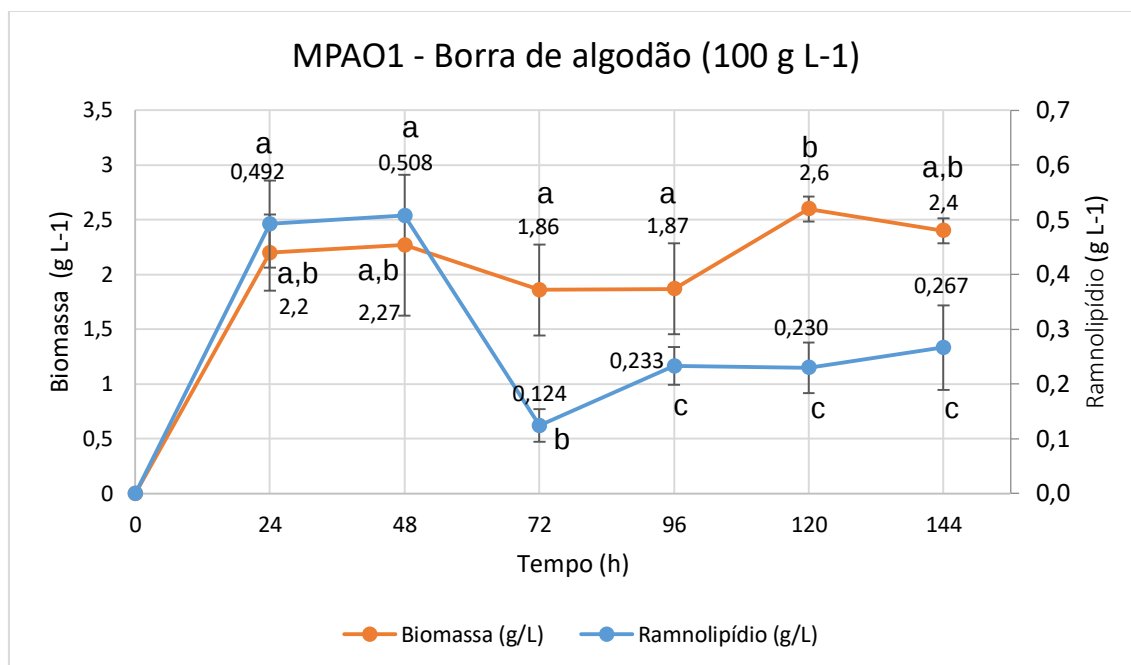
biomassa, sem diferença estatística relevante, e em seguida um decréscimo da biomassa que persiste até 144 horas. A produção de ramnolipídio começa entre 48 e 72 horas, ocorrendo o aumento da produção de 0,121 gL⁻¹ para 1,314 gL⁻¹, um aumento de mais de 10 vezes, seguido por uma estabilidade até 120 horas para em seguida aumentar para 2 gL⁻¹ entre 120 e 144 horas. No mesmo período, houve um aumento do consumo de óleo, de 15 gL⁻¹ para 3 gL⁻¹, indicando que o consumo foi direcionado para a produção de biotensioativo, e não mais para a biomassa como foram as primeiras 24 horas.

Ao final das 120 horas, foi observado o aumento da produção de ramnolipídio, atingindo 2,04 gL⁻¹, que foi a maior produção do experimento; o declínio da biomassa, atingindo 3,2 gL⁻¹, e o consumo do óleo residual até 1 gL⁻¹.

Observando o estudo de Ceccato (2013), a produção de ramnolipídios por meio de óleo de fritura para *P. aeruginosa* MPAO1 foi 4,6 vezes maior que a produção pela *P. aeruginosa* LBI 2A1, indicando que ela é mais recomendada quando esse resíduo é empregado como fonte de carbono. A melhor produção de ramnolipídio usando o óleo para a *P. aeruginosa* LBI 2A1 foi à concentração de 125 gL⁻¹ e 250 gL⁻¹, indicando que a concentração para a bactéria *P. aeruginosa* MPAO1 pode ser ainda maior. Usando o fator de conversão produto por substrato ($y_{p/s}$), a produção em 125 gL⁻¹ para *P. aeruginosa* LBI 2A1 foi 0,00332g/g, enquanto que dá *P. aeruginosa* MPAO1 usando 100gL⁻¹ foi 0,0204g/g.

No estudo de Pathania e Jana (2020) foram isoladas diversas cepas de *P. aeruginosa* originárias de chaminé. Usando óleo de fritura como fonte de carbono, foi observado que, em 40 horas, a biomassa entrou em fase exponencial e em 70 horas em fase estacionária, produzindo 1,25 gL⁻¹ de ramnolipídios nesse momento, o mesmo observado no presente experimento. Porém, no estudo foi usado 20 gL⁻¹, enquanto que no experimento foi usado 100 gL⁻¹.

Figura 4 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se borra de algodão como fonte de carbono para cepa selvagem MPAO1. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A maior produção de ramnolipídio foi as primeiras 48 horas atingindo a concentração de 0,508 gL⁻¹, porém não foi expressivo se comparado a produção em 24 horas ($p=0,8$). Em 72 horas houve uma queda seguida por um aumento em 96 horas que manteve a produção constante até o final ($p=0,78$). O crescimento bacteriano se manteve próximo de 2,2 gL⁻¹, não passando por variação significativa até 120 horas ($p=0,6$).

O mesmo comportamento foi observado no estudo de Lovaglio (2011a), o crescimento celular foi alto nas primeiras horas e depois se manteve constante até o final. Porém, diferiram no tempo da síntese de biossurfactante, a síntese ocorre em dois momentos, no estudo de Lovaglio (2011a) uma foi em 24 horas e outra após 48 horas, enquanto que, no presente estudo, uma produção foi até 48 horas e outra após 72 horas, indicando um atraso de 24 horas.

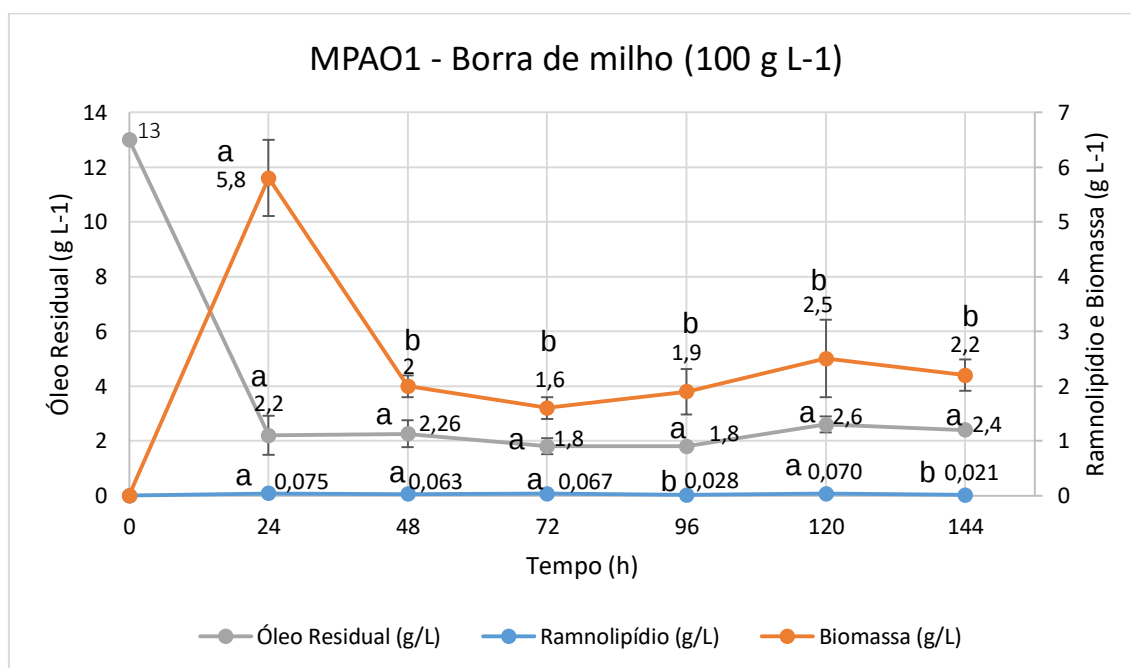
A produção de ramnolipídio nas primeiras 48 horas foi maior que a produção usando óleo de fritura no mesmo período. Já o crescimento da

biomassa, em todos os horários, foi inferior ao do óleo de fritura. Pelo fator de conversão biomassa por substrato, o óleo de fritura foi 0,067g/g, enquanto que dá borra de algodão foi 0,026g/g.

Comparando ainda o estudo de Lovaglio (2011a), a biomassa também aumentou em 24 horas, porém, houve um declínio no crescimento a partir de 40 horas, enquanto que, no presente estudo, a biomassa não apresentou variação significativa. A biomassa e a produção de ramnolipídios no experimento foram inferiores se comparado com a cepa LBI e suas mutantes.

O consumo da fonte de carbono não pode ser determinado, a metodologia empregada apresentou falhas, não sendo possível tal quantificação.

Figura 5 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se borra de milho como fonte de carbono para cepa selvagem MPAO1. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

As borras são compostas de ácidos graxos, esteróis, fosfato, carboidratos e poli álcoois, como o glicerol (DOWN, 1998)

A produção de ramnolipídios, a partir da borra de óleo de milho, não chegou a 0,1 gL⁻¹. A biomassa produzida foi a maior dentre as fontes de

carbono observadas até o momento, no mesmo período de 24 horas, com um crescimento de 5,6 gL⁻¹. Paralelo a isso, também houve a maior produção de ramnolipídio da fonte, que foi de 0,075 gL⁻¹, maior que a produção por óleo de fritura em 24 horas. A partir de 48 horas, o crescimento microbiano não é mais expressivo ($p=0,19$).

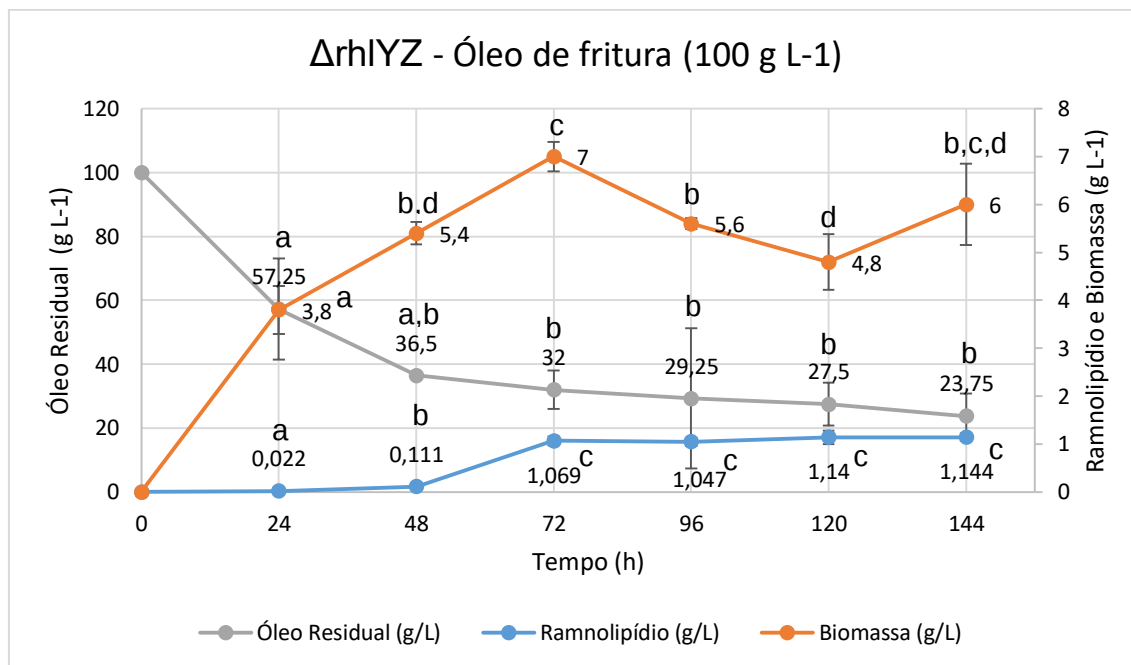
Tanto no estudo de Lovaglio (2011) quanto no experimento realizado, observou-se que o maior crescimento microbiano ocorreu em 24 horas, sendo que na MPAO1 a biomassa foi 56% maior que da LBI, porém a produção de ramnolipídios foi inferior em todos os tempos.

Silva (2014) também observou o rápido consumo da borra de milho como fonte de carbono nas primeiras 20 horas de experimento. No estudo, foi utilizada a concentração de 250 gL⁻¹, resultando em diferenças na produção de ramnolipídio e biomassa se comparado a Lovaglio (2011a) e ao presente estudo. Para a produção, obteve-se 8,42 gL⁻¹ em 68 horas; enquanto que a biomassa atingiu 8,75 gL⁻¹ entre 24 e 48 horas.

4.2 Produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhIYZ em fontes hidrofóbicas

Os resultados do experimento com a MPAO1 Δ rhIYZ utilizando óleo de fritura como fonte de carbono são observados na figura 6; da borra de algodão na figura 7; e da borra de milho na figura 8. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Figura 6 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de fritura como fonte de carbono para cepa mutante MPAO1 $\Delta rhIYZ$. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A produção pela cepa mutante apresentou variações quando comparado à cepa selvagem. A mais visível é o consumo de óleo, onde a mutante consumiu menos que a selvagem ao longo do experimento, o que é semelhante ao estudo de Silva (2018), em que a mutante $\Delta rhIYZ$ foi a que menos consumiu óleo entre as cepas. O maior consumo ocorreu em 24 horas, de 100 gL⁻¹ para 57,25 gL⁻¹. O menor consumo de óleo, se refletiu na menor produção de ramnolipídios pela cepa mutante, o que pode evidenciar a importância desses genes para a produção de ramnolipídios o que corrobora com os estudos de Abdel-Mawgoud *et al.* (2014).

Em ambas as cepas, as primeiras 48 horas são marcadas por uma produção baixa, inferior às borras, mesmo havendo consumo de óleo. Em 72 horas ocorreu um crescimento elevado, ultrapassando 1 gL⁻¹. Outra semelhança é que em 144 horas foi quando houve a maior produção de ramnolipídio utilizando tal fonte de carbono, na selvagem foi de 2,04 gL⁻¹ e na mutante, 1,14 gL⁻¹, uma redução na síntese em 45%, menor que a redução observada por Silva (2018) que foi de 72% em 144h e 61,65% em 168h.

comparando as mesmas cepas empregando óleo de girassol como fonte de carbono.

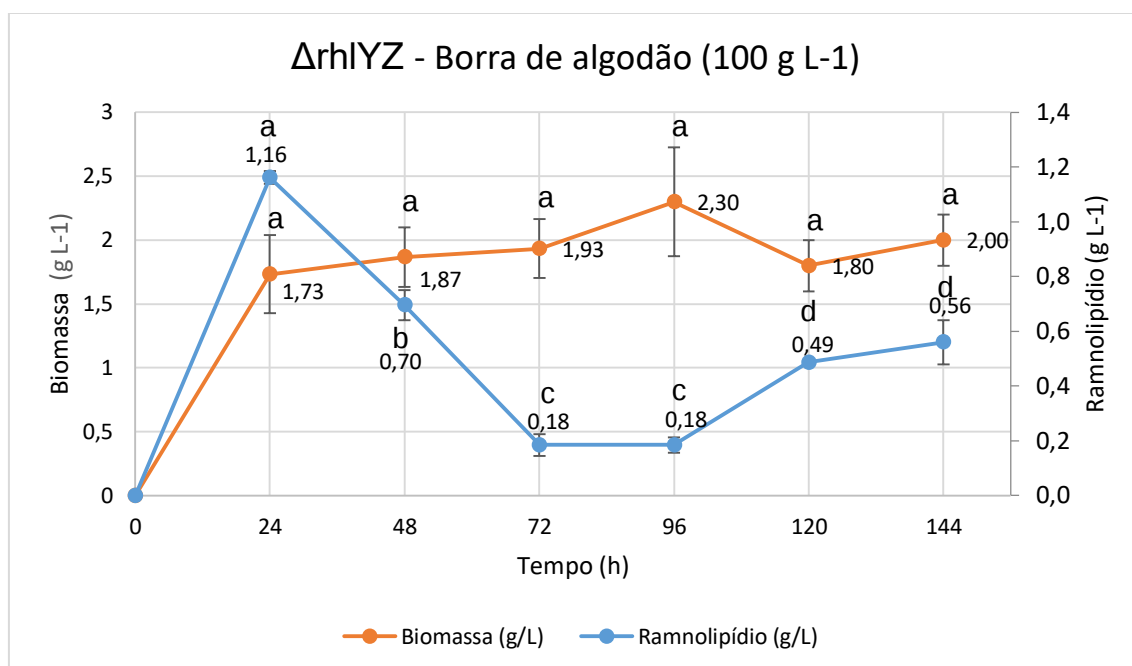
Os valores de biomassa da mutante foram crescentes até 72 horas, onde apresentou maior crescimento, havendo uma queda em 96 e em 120 horas se estabilizou até o final ($p=0,09$). Enquanto que na selvagem, o crescimento foi alto até 48 horas, seguido da fase estacionária até 120 horas.

O não consumo total do óleo pela mutante, pode indicar que a produção de ramnolipídios se manteria e até aumentaria quando entrasse na fase de decaimento, diferente da selvagem onde, em 144 horas, o consumo foi quase total.

Referente à biomassa, a cepa mutante apresentou crescimento mais rápido e mais duradouro do que a cepa selvagem, em 72 horas ela apresentou 6,9 gL⁻¹, enquanto a selvagem alcançou 6,7 gL⁻¹ em 96 horas, e em 144 horas ela apresentava 6 gL⁻¹, já a selvagem estava em fase de decaimento com 3,2 gL⁻¹.

A deleção do operon *rhYZ* pode ter implicado no desvio da rota da β -oxidação, processo catabólico importante na síntese da cadeia de ácidos graxos dos ramnolipídios, como explicado por Abdel-Mawgoud *et al.* (2014), se refletindo no menor consumo de óleo e na menor produção de ramnolipídio no experimento.

Figura 7 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se borra de algodão como fonte de carbono para cepa mutante MPAO1 $\Delta rhIYZ$. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.

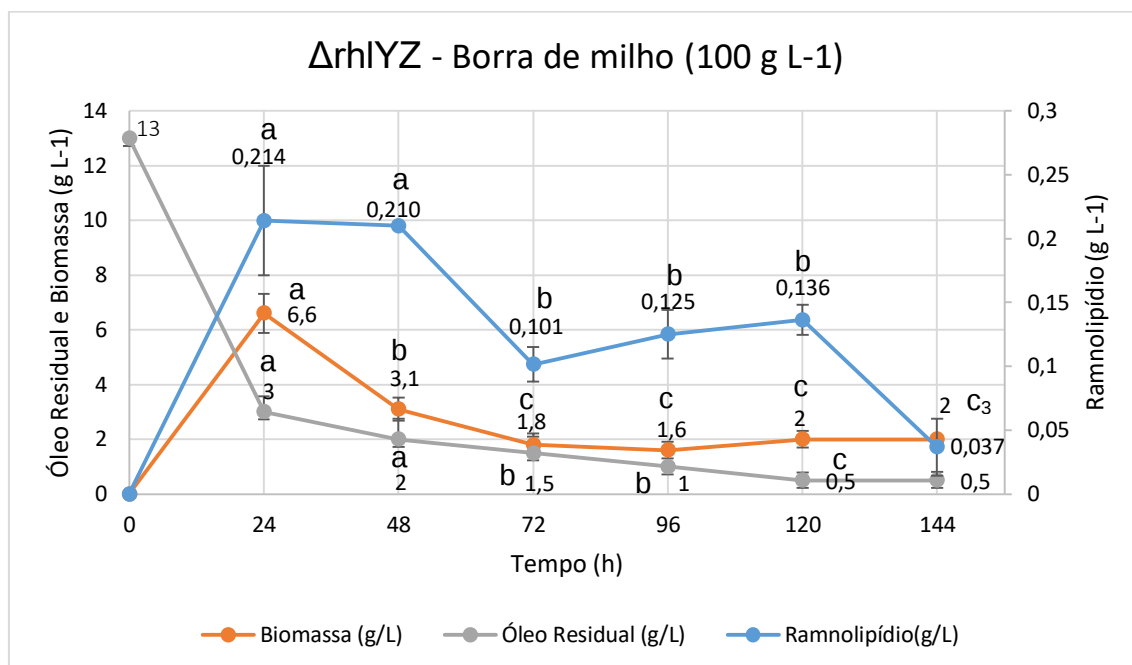


Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A cepa mutante apresentou melhor aproveitamento da borra de algodão se comparado a selvagem, como é possível observar através de $Y_{P/S}$, o da mutante foi 0,0116g/g enquanto da selvagem 0,00492.

Interessante ressaltar que, tanto na cepa selvagem quanto na mutante, a produção começa alta, seguido por uma diminuição na produção em 72 horas. Entretanto, na cepa mutante, a produção inicial só ocorre em 24 horas, retomando a produção em 120 horas, a qual se mantém constante até o final ($p=0,3$), enquanto que na cepa selvagem, a produção começa em 24 horas e se mantém até 48 horas, sendo que em 96 horas ocorre um aumento para em seguida se estabilizar até o final.

Figura 8 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se borra de milho como fonte de carbono para cepa mutante MPAO1 Δ rhIYZ. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Foi observado que, novamente, a borra de milho como fonte de carbono foi benéfica para o crescimento microbiano em 24 horas, maior do que em todos os experimentos envolvendo a selvagem e as mutantes para as fontes hidrofóbicas. No mesmo período, logo após ocorreu uma queda, sendo que a cepa selvagem manteve o mesmo valor até o final, e na mutante só se estabilizou em 72 horas ($p=0,2$).

A produção de ramnolipídios na mutante foi superior em relação à produção da selvagem em quase 3 vezes. A produção se manteve até 48 horas, enquanto na selvagem manteve-se até 72 horas. Em ambas ocorreu uma queda em seguida (96 horas para a selvagem e 72 horas para a mutante). A partir disso, a produção na selvagem foi constante na mutante até 144 horas ($p=0,09$), e na mutante até 120 horas, quando houve uma queda na produção para 0,037 gL⁻¹.

Observa-se que o maior crescimento microbiano em 24 horas para a mutante de MPAO1 foi superior ao crescimento da LBI e de suas mutantes na

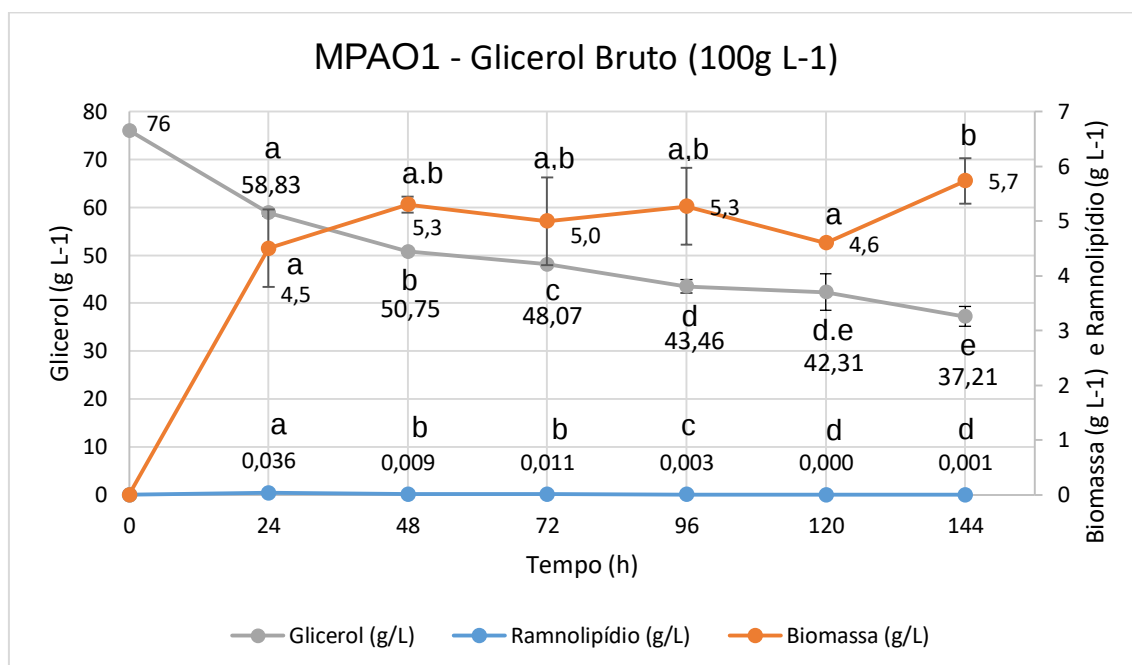
mesma fonte (LOVAGLIO, 2011a). Porém, a produção de ramnolipídios continuou menor frente a essas cepas.

A maior produção de ramnolipídios utilizando a linhagem mutante pode estar relacionada com outros compostos além das moléculas hidrofóbicas da borra de óleo de milho, uma vez que a β -oxidação não seria necessária para a produção do biotensoativo nesse contexto.

4.3 Produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* MPAO1 selvagem em fontes hidrofílicas

Os resultados do experimento com a MPAO1 selvagem utilizando glicerol bruto são observados na figura 9; glicerol bidestilado na figura 10; e melaço na figura 11. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 9 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se glicerol bruto como fonte de carbono para cepa MPAO1 selvagem. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

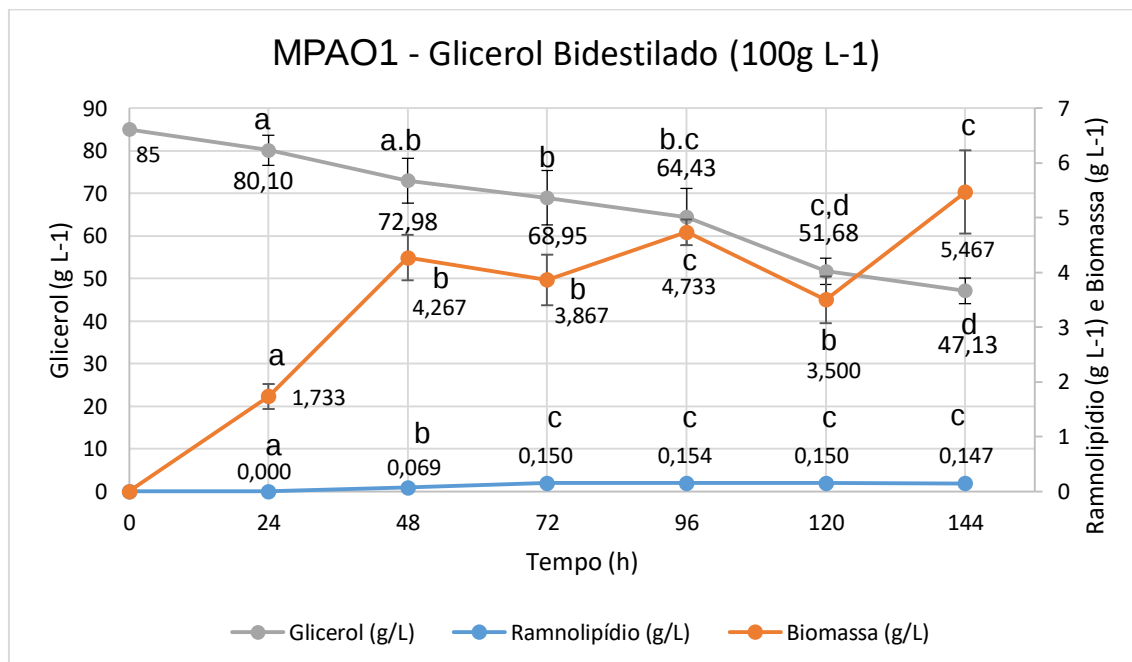
Os valores mais baixos de produção de ramnolipídios foram obtidos a partir do glicerol bruto. Em 24h foi quando ela apresentou a melhor produção

em seus parâmetros. A biomassa não apresentou mudança significativa em nenhum tempo ($p=0,19$). A concentração de ramnolipídios usando glicerol bruto, já é considerada zero em 120 horas, mesmo que nesse tempo ainda tenha glicerol disponível (37,21 gL⁻¹).

Em 24 horas foi quando houve o maior consumo de glicerol, de 100 gL⁻¹ para 58 gL⁻¹. A baixa produção de ramnolipídios usando glicerol, quando comparado com as fontes hidrofóbicas, também foi observado no estudo de Silva (2018).

Pagliaro e Rossi (2010) afirmam que o glicerol bruto é uma mistura de vários compostos, como ácidos graxos livres, álcool (frequentemente metanol), sabão, sais, água, mono, di e triacilgliceróis, éster metálico e outros. Acredita-se que o micro-organismo, inicialmente, tenha usado os ácidos graxos livres do meio para crescimento e produção de biossurfactante, mas a subsequente diminuição da concentração desses compostos levou a uma diminuição na produção, uma vez que mesmo que toda a fonte bruta não tenha se esgotado. O mesmo perfil foi observado no estudo de Balieiro (2017) usando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2AI.

Figura 10 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se glicerol bidestilado como fonte de carbono para cepa MPAO1 selvagem. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

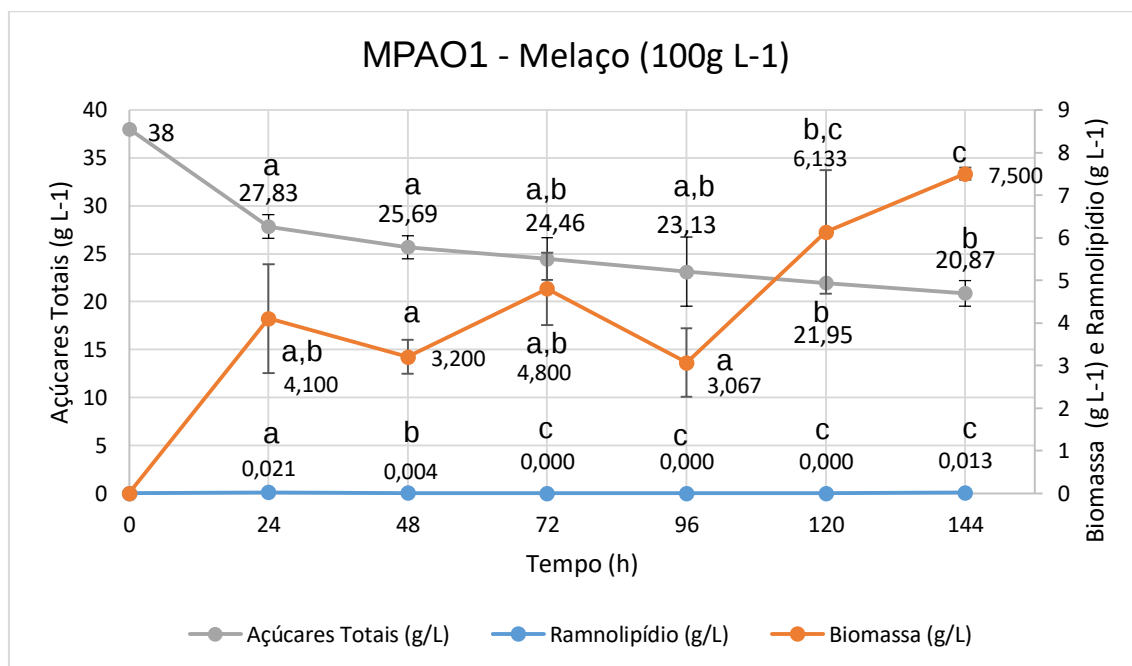
A produção da ramnolipídio a partir de glicerol bidestilado foi 90% maior que usando glicerol bruto em 24 horas, porém ainda foi baixa se comparada às produções das fontes hidrofóbicas. A produção de biossurfactante se mantém estável de 72 horas até o final do experimento ($p=0,07$). É observável também que o consumo de glicerol bruto foi maior que do glicerol purificado, mesmo não implicando em produções significativas do biotensioativo.

Mesmo o glicerol bidestilado apresentando melhor desempenho que o glicerol bruto, a produção continua sendo baixa se comparado às fontes hidrofóbicas, tanto da cepa selvagem quanto da mutante. A única fonte hidrofóbica que é superada pelo glicerol bidestilado é a borra de milho na linhagem selvagem.

O presente resultado corrobora com o estudo de Balieiro (2017), onde a produção usando glicerol tratado foi superior à produção usando glicerol bruto. Provavelmente esse resultado seja possível devido à diminuição de compostos encontrados no glicerol bruto, como metanol e sais que possam inibir a síntese do biossurfactante. Já no estudo de Paula *et al.* (2017), os meios utilizando

glicerol bruto como fonte de carbono obtiveram melhor crescimento microbiano e acúmulo de P3HB do que os meios utilizando glicerol puro para a bactéria *Pandoraea sp.*

Figura 11 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se melaço como fonte de carbono para cepa MPAO1 selvagem. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O melaço apresentou menor desempenho se comparado a todas as fontes utilizadas no presente estudo.

O melaço apresentou o maior crescimento microbiano entre todos os experimentos, com 7,5 g/L em 144 horas. Em outros tempos a biomassa foi superior em relação a todas as borras estudadas como fonte de carbono, menos no tempo de 24 horas, quando a borra de milho da cepa selvagem alcançou 5,8 g/L e da cepa mutante 6,6 g/L. O alto crescimento microbiano indica que a fonte estava sendo usada para formação de outros metabólitos que não eram os ramnolipídios como os poli-hidroxialcanoatos.

Nos estudos de Patel e Desai (1997) eles obtiveram 0,24 g/L de ramnolipídio em 96 horas usando melaço como fonte de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* GS3, enquanto que Suryanti, Marliyana e Wulandari

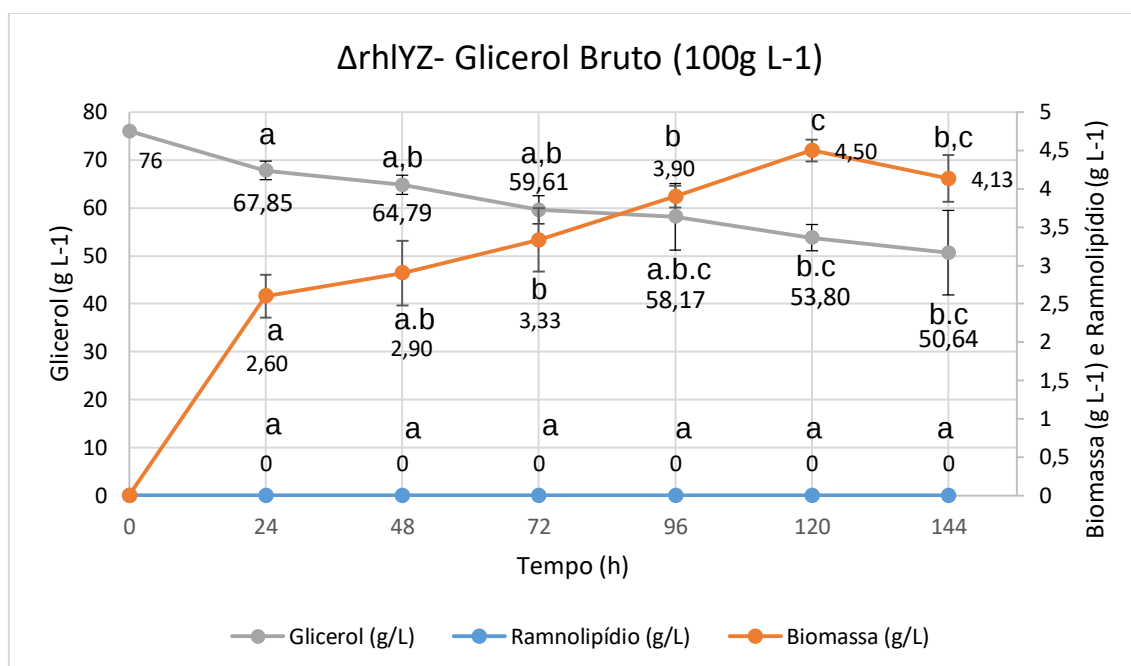
(2005), usando a mesma fonte, não obtiveram nenhuma produção para *Pseudomonas fluorescens*.

No estudo de Gutierrez e Silva (1993) eles destacam que, mesmo o melaço sendo uma fonte predominante de carboidratos, existe algumas cadeias de lipídios presentes na composição, como o ácido linoleico que está em alta concentração, seguido do ácido palmítico, oleico e linolênico. Além da presença dos ácidos graxos no meio, o micro-organismo pode ter utilizado síntese *de novo* para conversão dos açúcares em ácidos graxos. A presença desses ácidos pode explicar a produção de ramnolipídios nos tempos 24, 48 e 144 horas, já que o micro-organismo tem preferência por esses ácidos, como o linoleico e o oleico (BENINCASA *et al.*, 2002).

4.4 Produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhIYZ em fontes hidrofílicas

Os resultados do experimento com a MPAO1 Δ rhIYZ utilizando glicerol bruto são observados na figura 12; glicerol bidestilado na figura 13; e melaço na figura 14. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 12 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se glicerol bruto como fonte de carbono para cepa MPAO1 Δ rhLYZ. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



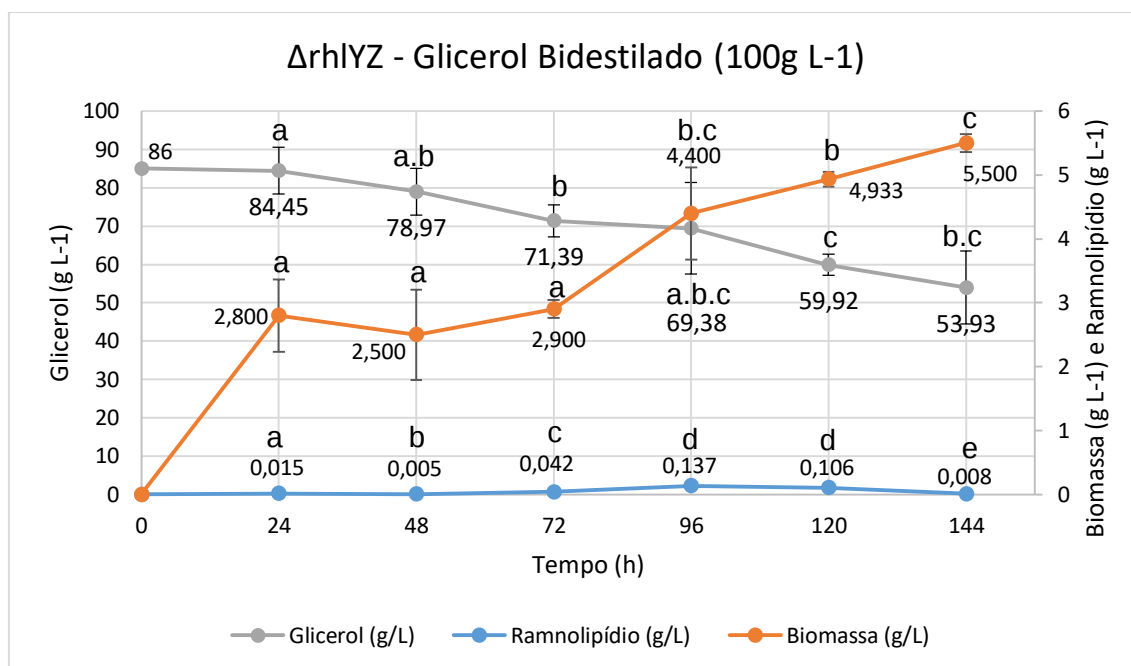
Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Não houve produção de ramnolipídios na cepa mutante, enquanto que na cepa selvagem, uma produção pequena durou até 96 horas, quando foi para zero. A biomassa também apresentou diferença entre ambas, o crescimento da selvagem, em 24 horas, já era de 4,50 gL⁻¹, enquanto que da mutante só alcançou esse valor em 120 horas, indicando dificuldades de síntese. Com relação ao crescimento os resultados de biomassa estão de acordo com o estudo de Silva (2018), onde também houve uma diminuição do crescimento na cepa mutante se comparado com a cepa selvagem, porém com relação a produção de ramnolipídios, a mutante diferiu apenas em 0,20 gL⁻¹ da produção máxima da selvagem.

A cepa mutante consumiu menos glicerol do que a cepa selvagem, implicando que o impedimento de uma via da β -oxidação evitou o consumo destes, mesmo se tratando de uma fonte hidrofílica, o que corrobora com os estudos de Abdel-Mawgoud *et al.* (2014). O menor consumo pode estar relacionado com o menor crescimento microbiano, inferindo em todos os períodos, demonstrando que a deleção dos genes rhLYZ traz forte influência.

A deleção dos genes *rhIYZ* demonstrou ser de grande impacto na produção de ramnolipídios quando empregado glicerol bruto como fonte de carbono, mesmo sendo uma fonte hidrofílica, o que está de acordo com o estudo de Abdel-Mawgoud *et al.* (2014).

Figura 13 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se glicerol bidestilado como fonte de carbono para cepa MPAO1 Δ *rhIYZ*. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

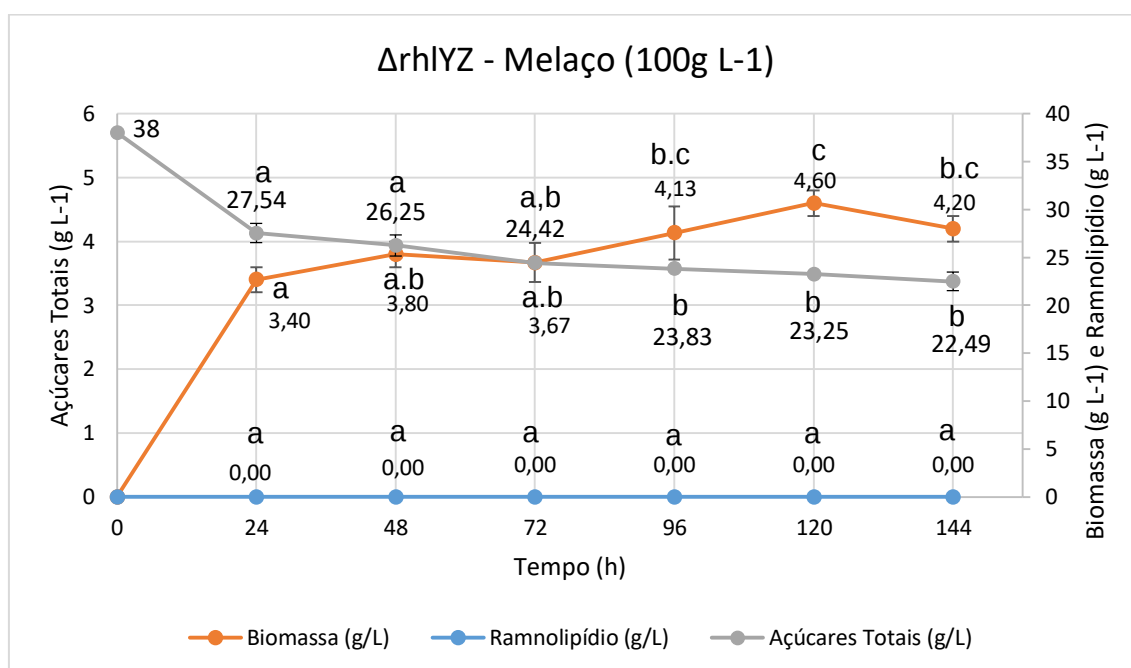
Os resultados usando a cepa mutante também apresentaram notórias diferenças se comparado ao experimento com a cepa selvagem. Houve um atraso na formação de biomassa; em 48 horas a cepa selvagem já tinha alcançado 4,2 gL⁻¹, enquanto que na cepa mutante, o valor mais próximo (4,4 gL⁻¹) foi alcançado em 96 horas, mas em 144 horas, ambas as cepas apresentaram valores próximos sem diferença significativa ($p=9$).

A produção de ramnolipídios também se mostrou ínfima. Na cepa selvagem, a produção era de 0,150 gL⁻¹ em 72 horas de experimento, enquanto que na mutante, o valor não apresentou diferença significativa na produção, sendo que em 96 horas obteve-se 0,137 gL⁻¹. Porém, na cepa mutante, a produção diminuiu bruscamente em 144 horas e já em 120 horas

ela era menor que da cepa selvagem, que manteve sua produção constante até o final do experimento. Esse fato também foi observado no estudo de Silva (2018).

O consumo de glicerol bidestilado apresentou as mesmas diferenças encontradas no consumo de glicerol bruto. O consumo foi menor que da cepa selvagem, indicando que esse foi o experimento que houve menor consumo da fonte de carbono quando comparados os dois tipos de gliceróis. Mesmo restando 53 gL-1de glicerol, a produção do biossurfactante era próximo do zero, o que pode sugerir uma inibição pela fonte de carbono.

Figura 14 – Biomassa e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se melaço como fonte de carbono para cepa MPAO1 Δ rhIYZ. Condições: 37°C, 200 rpm e 144 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O melaço como fonte de carbono para a cepa mutante, não apresentou produção de biossurfactante, e sua biomassa foi inferior a da cepa selvagem. Em 24 horas a cepa selvagem apresentava 4,1 gL-1de biomassa, e na mutante tal valor só foi obtido em 96 horas. Todos os experimentos com as fontes hidrofílicas para a cepa mutante apresentaram biomassa inferior que da cepa selvagem.

Na cepa selvagem, a biomassa produzida a partir do melaço

representou uma biomassa de 7,5 gL⁻¹ em 144 horas, e no caso da cepa mutante, a maior biomassa foi obtida utilizando o óleo de fritura em 72 horas.

O consumo de açúcares, entre ambas as cepas, não apresentou diferença significativa ($p > 0.05$), demonstrando que a deleção do operon *rhIYZ* não interferiu no consumo de carboidratos, mas houve diferença na biomassa formada.

Quando as fontes de carbono empregadas foram hidrofílicas a cepa com a deleção no gene *rhIYZ*, apresentou baixa produção de ramnolipídios, vale ressaltar que esses dados estão de acordo com a hipótese levantada por Abdel-Mawgoud *et al.* (2014), que relatou a diminuição na produção desse metabólito pelo mutante mesmo em fontes hidrofílicas.

A deleção do operon *rhIYZ* reduziu o consumo de óleo, o que está de acordo com o estudo de Silva (2018) e Abdel-Mawgoud *et al.* (2014), e no óleo de fritura a produção de biossurfactante pela mutante foi inferior a produção da cepa selvagem.

4.5 Propriedades da Solução de Ramnolipídios

4.5.1 Tensão Superficial e Interfacial

Os valores das tensões superficiais e interfaciais, referentes à produção de ramnolipídios usando óleo de fritura, borra de algodão e borra de milho como fonte de carbono, para as cepas MPAO1 e MPAO1 Δ *rhIYZ*, estão esquematizadas na tabela 1.

Tabela 1 – Tensão superficial e interfacial da solução de 0,1% (p/v) de ramnolipídios produzidos usando como fonte de carbono óleo de fritura, borra de algodão e borra de milho. As medições foram feitas em temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos em (mN/m).

<i>Cepa</i>	<i>Fonte de Carbono</i>	<i>Tensão Superficial</i>	<i>Tensão Interfacial</i>
<i>MPAO1</i>	Óleo de Fritura	30,75 ± 0,35	1,3 ± 0,1
	Borra de Algodão	39,25 ± 0,35	2,6 ± 0,3
	Borra de Milho	30,25 ± 0,35	1,5 ± 0,1
<i>MPAO1 ΔrhIYZ</i>	Óleo de Fritura	32 ± 0,71	1,5 ± 0,1
	Borra de Algodão	39,5 ± 0	2,1 ± 0,2
	Borra de Milho	30,25 ± 0,35	1,2 ± 0,1

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A tensão superficial das amostras ficaram entre 39,5 mN/m, da borra de algodão da cepa mutante, e 30,25 mN/m, da borra de milho da cepa selvagem. Apesar dos ramnolipídios terem sido produzidos em diferentes cepas, não houve diferença significativa na diminuição da tensão superficial entre elas, os fatores determinantes para as variações apresentadas foram às fontes de carbono empregadas. Há relatos na literatura que a fonte de carbono pode alterar a composição e distribuição dos congêneres de ramnolipídios produzidos (FIECHTER, 1992; CHANG *et al.*, 2005)

Os melhores resultados de tensão superficial foram obtidos por meio dos ramnolipídios produzidos utilizando óleo de fritura e borra de milho como fonte de carbono, alcançando valores semelhantes aos obtidos por Costa *et al.* (2006) que utilizou óleos nativos, como óleo de andiroba e cupuaçu, como fonte de carbono. Nesses experimentos a tensão superficial foi reduzida para 30,26 mN/m e 30,4 mN/m, respectivamente. A tensão superficial obtida quando a fonte de carbono utilizada foi borra de algodão, tanto na cepa selvagem quanto na cepa mutante, foi o resultado mais alto observado.

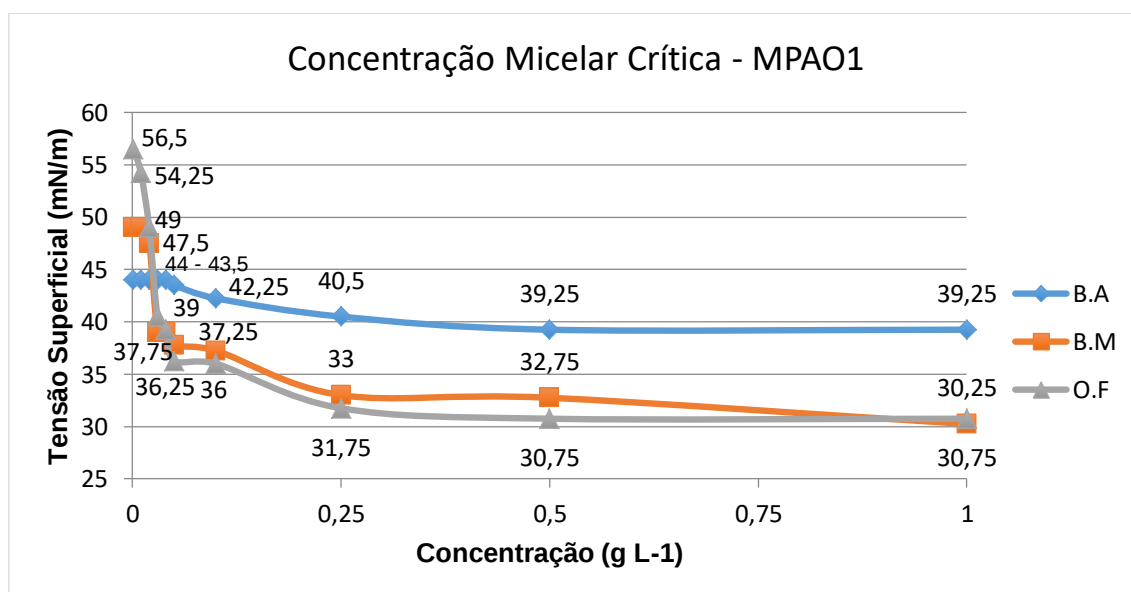
A tensão interfacial não diferiu significativamente entre as cepas quando comparado aos dados do meio de cultura utilizando óleo de fritura ou borra de

milho. Porém quando se utilizou borra de algodão, a cepa selvagem apresentou maior tensão interfacial que da cepa mutante. A solução de ramnolipídios produzidos por meio do óleo de fritura pra cepa selvagem, e a solução obtida pela borra de milho da cepa mutante, foram as que apresentaram as melhores propriedades tensoativas.

4.5.2 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica dos ramnolipídios produzidos pela cepa MPAO1 e MPAO1 Δ rhIYZ, estão apresentadas na figura 15 e 16, respectivamente.

Figura 15 – Tensão Superficial (mN/m) de soluções em diferentes concentrações de ramnolipídios (1 – 1000 mg L⁻¹) produzidos pela cepa MPAO1 em óleo de fritura, borra de algodão e borra de milho.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O aumento da concentração de ramnolipídios permite a formação de micelas e vesículas (VINSON *et al.*, 1989; SÁNCHEZ *et al.*, 2007). A formação dessas microestruturas é influenciada pelos congêneres presentes na solução e de sua proporção, sendo esses os principais componentes para formação da concentração micelar crítica (ABALOS *et al.*, 2001; BENINCASA *et al.*, 2004). Lovaglio *et al.* (2014) descreve que nas concentrações abaixo de 0,03 g L⁻¹, já ocorre uma diminuição gradual da tensão superficial, podendo ser considerada

primeira zona de transição, o mesmo foi observado nos experimentos com os ramnolipídios de óleo de fritura e borra de milho no presente estudo.

A estabilização da tensão em decorrência da concentração de ramnolipídios é chamada de zona de transição. A quantidade de zonas varia dependendo dos congêneres presentes na solução, e do grau de hidrofobicidade deles, o que influencia na formação das microestruturas (COHEN; EXEROWA, 2007; HAN *et al.*, 2004).

Alguns autores alegam que a primeira zona de transição trata-se da formação de micelas de mono-ramnolipídios, e a segunda seria a concentração micelar crítica, onde o aumento da concentração não diminuiria mais a tensão superficial. Já outros consideram a primeira zona como a formação de agregados que antecederiam as micelas (COHEN; EXEROWA, 2007; PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2009).

Em todos os experimentos, a tensão superficial diminuiu com o aumento da concentração de ramnolipídios. O óleo de fritura foi à fonte de carbono que gerou a solução de ramnolipídios com maior tensão superficial nas concentrações iniciais.

A solução contendo 0,01 gL⁻¹ apresentou tensão superficial de 52,25 mN/m, com o aumento da concentração de ramnolipídios na solução foi possível observar uma redução nas tensões superficiais até alcançar 36 mN/m, quando empregada a solução de 0,05 gL⁻¹.

Depois de atingida a concentração 0,05 gL⁻¹ até 0,1 gL⁻¹ não houve mudança significativa na tensão superficial ($p=0,4$), apresentando estabilidade em 36 mN/m. Quando são utilizadas concentrações do tensoativo superior ou igual a 0,5 gL⁻¹ essa propriedade físico química se estabiliza em 30,75 mN/m, não apresentando mais mudança com o aumento da concentração, alcançando assim a concentração micelar crítica.

A solução de ramnolipídios provenientes da fermentação utilizando borra de algodão como fonte de carbono foi o que apresentou menor tensão superficial nas concentrações iniciais, com o valor de 44 mN/m. Tal valor só sofreu mudança significativa ($p=0,05$) na concentração de 0,25 g L⁻¹, diminuindo a tensão superficial para 40,5 mN/m. Essa propriedade estabiliza-se em 39,25 mN/m, a partir de 0,5 gL⁻¹.

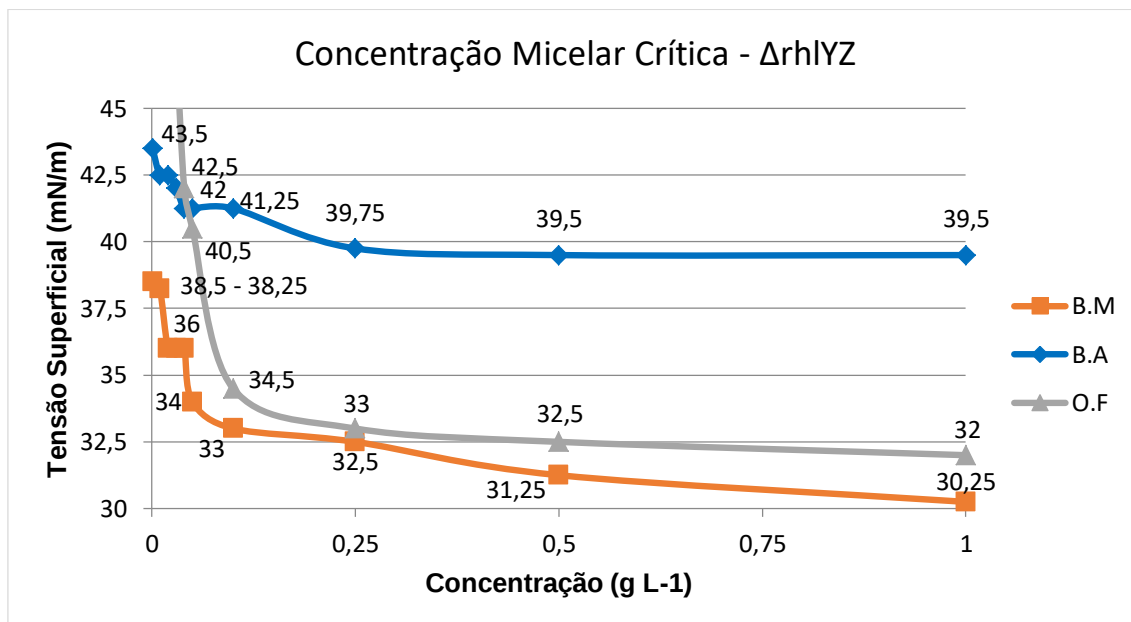
Apesar de apresentar os menores valores de tensão superficial nas concentrações mais baixas, a solução de ramnolipídios da borra de algodão foi o que sofreu menor variação ao longo do aumento da concentração de biossurfactante, saindo de 44 mN/m para 39,25 mN/m.

Nos experimentos empregando borra de milho como fonte de carbono, as soluções de ramnolipídios apresentaram um perfil de tensão superficial semelhante ao observado no experimento em que a fonte de carbono empregada foi óleo de fritura, diferindo apenas nas menores concentrações de ramnolipídios.

Nos ramnolipídios derivados do experimento usando borra de milho como fonte de carbono, pode se observar estabilidade na tensão superficial nas concentrações 0,03 e 0,04 gL⁻¹, em 39 mN/m, e nas concentrações 0,05 e 0,1 gL⁻¹, em 37,75 mN/m, indicando zonas de transição. Porém os valores de tensão nas concentrações mais altas avaliadas no presente estudo não se estabilizaram, apresentando 32,75 mN/m em 0,5 gL⁻¹ e 30,25 mN/m em 1 gL⁻¹.

Apesar do grupo experimental em que se utilizou de borra de óleo de milho como fonte de carbono para a produção de ramnolipídios ser o que apresentou a melhor redução na tensão superficial, não houve diferença significativa do resultado se comparado aos experimentos em que a fonte de carbono foi óleo de fritura em 1gL⁻¹(p=0,2).

Figura 16 – Tensão Superficial (mN/m) de soluções em diferentes concentrações de ramnolipídios (1 – 1000 mg L⁻¹) produzidos pela cepa MPAO1 Δ rhIYZ em óleo de fritura, borra de algodão e borra de milho.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Comparando a concentração micelar crítica proporcionada pelos ramnolipídios da cepa selvagem e da cepa mutante, observa-se que na concentração 1 gL⁻¹, o valor da tensão superficial de ambas é praticamente o mesmo; $p=0,08$ para os experimentos com a solução de ramnolipídios do óleo de fritura, e $p=0,4$ para as soluções com os ramnolipídios de borra de algodão e borra de milho.

Assim como no experimento com a cepa selvagem, a concentração micelar crítica do grupo experimental em que se utilizou borra de algodão como fonte de carbono foi 0,5 gL⁻¹, não alterando a tensão em 1 gL⁻¹. Outra semelhança observada foi para os experimentos em que a fonte de carbono empregada para a produção de ramnolipídios foi a borra de milho, onde houve variação na tensão superficial entre as concentrações 0,5 gL⁻¹ e 1 gL⁻¹, não estabilizando antes da concentração mais alta avaliada.

A principal diferença na CMC dos experimentos utilizando essas duas linhagens, é que nas soluções de ramnolipídios produzidos pela mutante, utilizando a borra de óleo de milho, a tensão superficial é mais baixa já nas concentrações iniciais; na cepa MPAO1, a tensão em 0,001 gL⁻¹ é de 49 mN/m,

enquanto que nos experimentos utilizando o mutante, na mesma concentração, é de 38,5 mN/m. O mesmo é observado para os experimentos com borra de óleo de algodão.

Isso pode indicar que a formação dos agregados de ramnolipídios é mais rápida na mutante do que na selvagem, havendo alteração do local de cada zona de transição, o que sugere que para essas fontes de carbono, seria interessante realizar análise em espectrômetro de massa, a fim de identificar a diferença nos homólogos de ramnolipídios produzidos pelas duas linhagens.

O gene *rhIYZ* é o responsável principal pela formação das cadeias de 10 carbonos dos ramnolipídios, sua deleção pode ter gerado ramnolipídios de cadeias mais curtas, o que facilitaria a formação de micelas em baixas concentrações, pois quanto maior a parte hidrofóbica menor é o CMC (MESQUITA, 2004).

O mesmo não foi observado para os experimentos com óleo de fritura como fonte de carbono. As soluções de ramnolipídios produzidas pela estirpe mutante apresentaram valores de tensão superficial superiores nas concentrações mais baixas, quando comparadas com os ramnolipídios produzidos pela cepa selvagem nessa mesma fonte de carbono, mesmo que na concentração final o valor obtido seja próximo.

A solução de ramnolipídios pode conter componentes não metabolizados, como ácidos graxos, que foram extraídos juntos com o ramnolipídio, o que influencia as características dos biosurfactantes, como a solubilização (COSTA *et al.*, 2006; MATA-SANDOVAL; KARNIS; TPRRENTS, 2001).

4.5.3 Estabilidade de emulsão

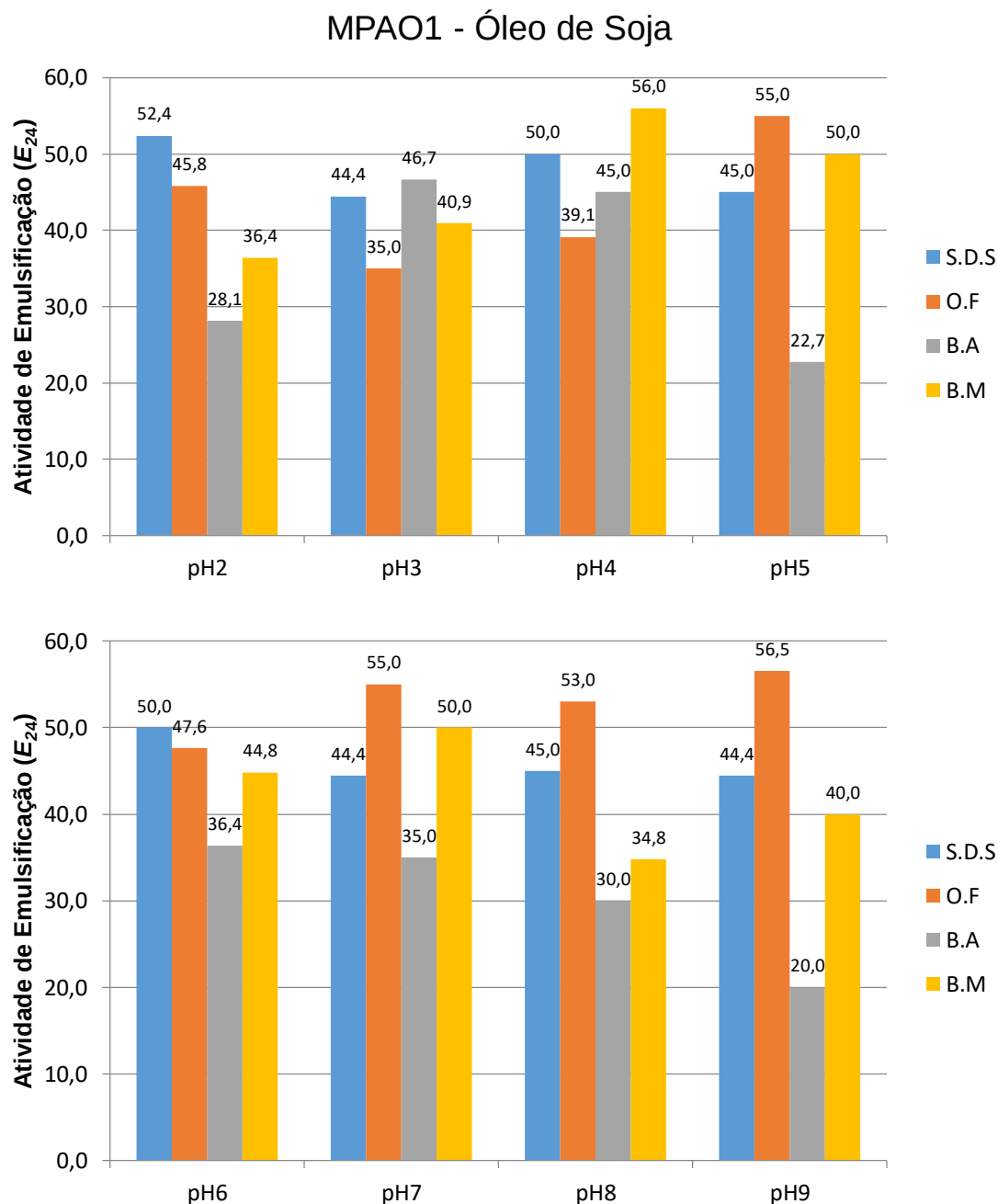
A estabilidade de emulsão foi realizada a partir da solução de ramnolipídios obtidos por meio de três fontes: óleo de fritura, borra de algodão e borra de milho. As cepas usadas foram a MPAO1 e sua mutante, $\Delta rhIYZ$

4.5.3.1 Óleo de Soja

Os experimentos de emulsificação referentes aos ramnolipídios produzidos pela cepa MPAO1, em diferentes pHs contra óleo de soja, estão

representados pela figura 17, e os referentes à cepa MPAO1 Δ rhIYZ na figura 18.

Figura 17 – Atividade de emulsificação contra óleo de soja. Medições feitas a partir de 24 horas da agitação das soluções 0,1% (p/v) de ramnolipídios em diferentes pHs. Ramnolipídios produzidos pela cepa MPAO1.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Segundo diversos autores a morfologia dos ramnolipídios é sujeita a outros fatores além dos congêneres e sua quantidade, como força iônica, co-

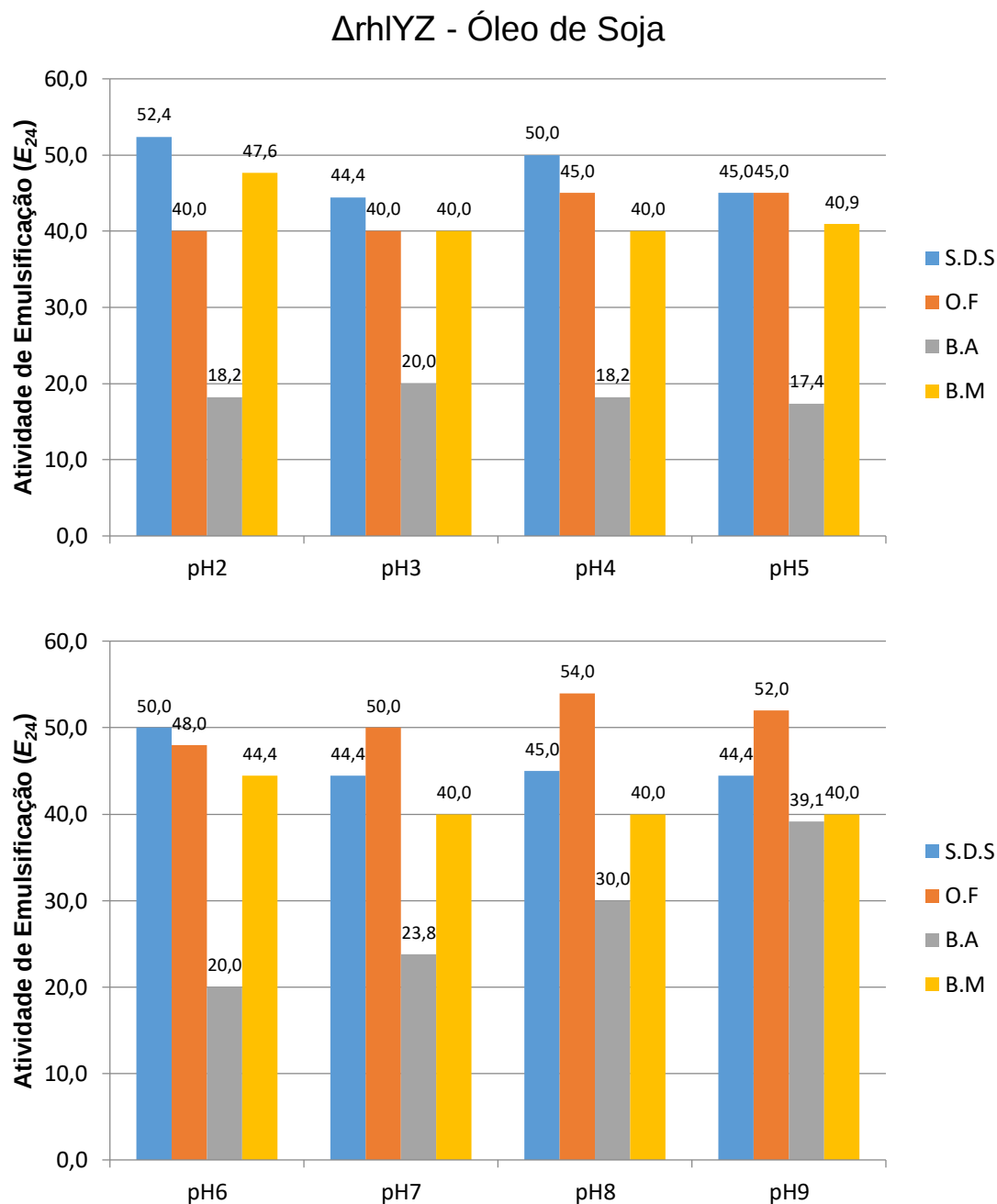
solutos, contaminantes e, principalmente pelo pH (CHAMPION *et al.*, 1995; LOVAGLIO, 2011b; MATA *et al.*, 2004; VILLENEUVE *et al.*, 1998).

O pH das soluções de ramnolipídios pode variar dependendo da fonte de carbono empregada. Na ausência de aditivos, os monômeros se encontram protonados e desprotonados, o que facilita a interação entre eles, devido à diminuição da repulsão eletrostática, e conseqüentemente permitindo estabilização dos agregados formados (ISHIGAMI *et al.*, 1993; LOVAGLIO, 2011b). Kitamoto *et al.* (2009) definiu a formação das estruturas de ramnolipídios em diferentes pHs; entre 4,3 e 5,8 as vesículas são formadas, entre 6,2 e 6,6 ocorre formação de partículas lipídicas, e acima de 6,8 as micelas são formadas de maneira espontânea. A capacidade de reversão dos ramnolipídios em diferentes faixas de pH se deve a presença do ácido carboxílico.

Como nos valores de tensão superficial e concentração micelar crítica, as soluções derivadas dos ramnolipídios produzidos a partir da borra de milho e do óleo de fritura apresentaram os melhores resultados. As emulsificações, em alguns casos, foram superiores aos de S.D.S (Dodecil Sulfato de Sódio), porém, a emulsificação por S.D.S foi que apresentou melhor estabilidade em diferentes faixas de pH, enquanto que do óleo de fritura variou entre 35 a 55; da borra de algodão entre 20 a 46; e da borra de milho entre 34 e 56.

Os agregados de ramnolipídios produzidos utilizando borra de milho apresentaram os melhores resultados, nos pHs acima de 2,0; enquanto que nos experimentos utilizando o óleo de fritura foi a partir do pH 5,0, o que indica que o aumento da concentração de OH⁻ garantiu a melhor estabilização dos congêneres dessas fontes, corroborando com o estudo de Lovaglio *et al.* (2014) e Pornsunthorntaweet *et al.* (2009), onde em pHs baixo ocorre a diminuição da protonação dos ramnolipídios, diminuindo assim sua reação com o meio. Já os valores referentes ao grupo experimental que utilizou borra de algodão, ficaram abaixo das demais fontes na maioria dos pHs, destacam-se apenas nos pHs 3 e 4.

Figura 18 – Atividade de emulsificação contra óleo de soja. Medições feitas a partir de 24 horas da agitação das soluções 0,1% (p/v) de ramnolipídios em diferentes pHs. Ramnolipídios produzidos pela cepa MPAO1 Δ rhIYZ.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Nos experimentos utilizando os ramnolipídios produzidos pela cepa mutante, obteve-se menor variação que quando a linhagem selvagem foi à produtora. O grupo experimental usando óleo de fritura ficou entre 40 e 54; já quando a fonte de carbono foi a borra de algodão, os valores variaram entre 17

e 39; Para a borra de milho entre 40 e 47. A solução da borra de milho foi o que apresentou melhor estabilidade, mesmo não alcançando os mesmos valores altos do experimento com a cepa selvagem.

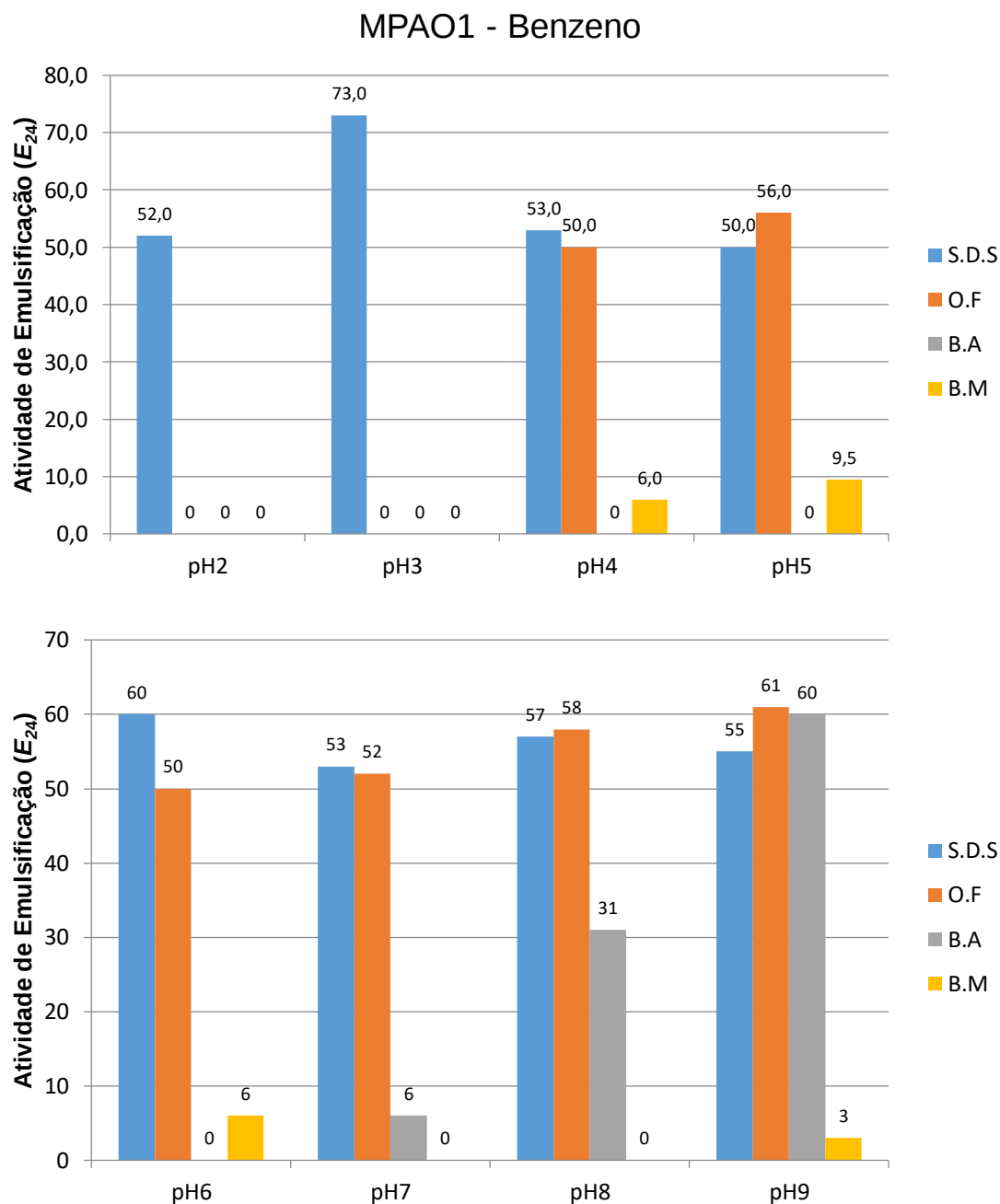
Conforme o aumento do pH, é possível observar o aumento da emulsificação das soluções referentes aos experimentos utilizando as fontes de carbono óleo de fritura e da borra de algodão, sendo que este último diferiu dos resultados da cepa selvagem, porém continuou abaixo das demais fontes. Os da borra de milho ficaram indiferentes ao longo do pH. Acima do pH 7, todos os valores de emulsificação do óleo de fritura foram superiores aos de S.D.S, semelhante aos da cepa selvagem.

Pornsunthorntawee *et al.* (2009) testou a capacidade de emulsificação de diversos óleos vegetais, como óleo de azeite de oliva, palma e soja. Observou-se que a porcentagem de emulsificação ficou acima de 50% em 24 horas, porém manteve-se abaixo da emulsificação por S.D.S, semelhante aos resultados do presente experimento. O autor destaca que, os resultados referentes a emulsificação contra óleo de palma, só foram superiores que os outros devido o caldo de ramnolipídios ter sido produzido com esse mesmo óleo como fonte de carbono.

4.5.3.2 Benzeno

Os experimentos de emulsificação referentes às soluções, em diferentes pHs, de ramnolipídios produzidos pela cepa MPAO1 contra benzeno, estão representados pela figura 19, e os referentes à cepa MPAO1 Δ rhIYZ na figura 20.

Figura 19 – Atividade de emulsificação contra benzeno. Medições feitas a partir de 24 horas da agitação das soluções 0,1% (p/v) de ramnolipídios em diferentes pHs. Ramnolipídios produzidos pela cepa MPAO1.



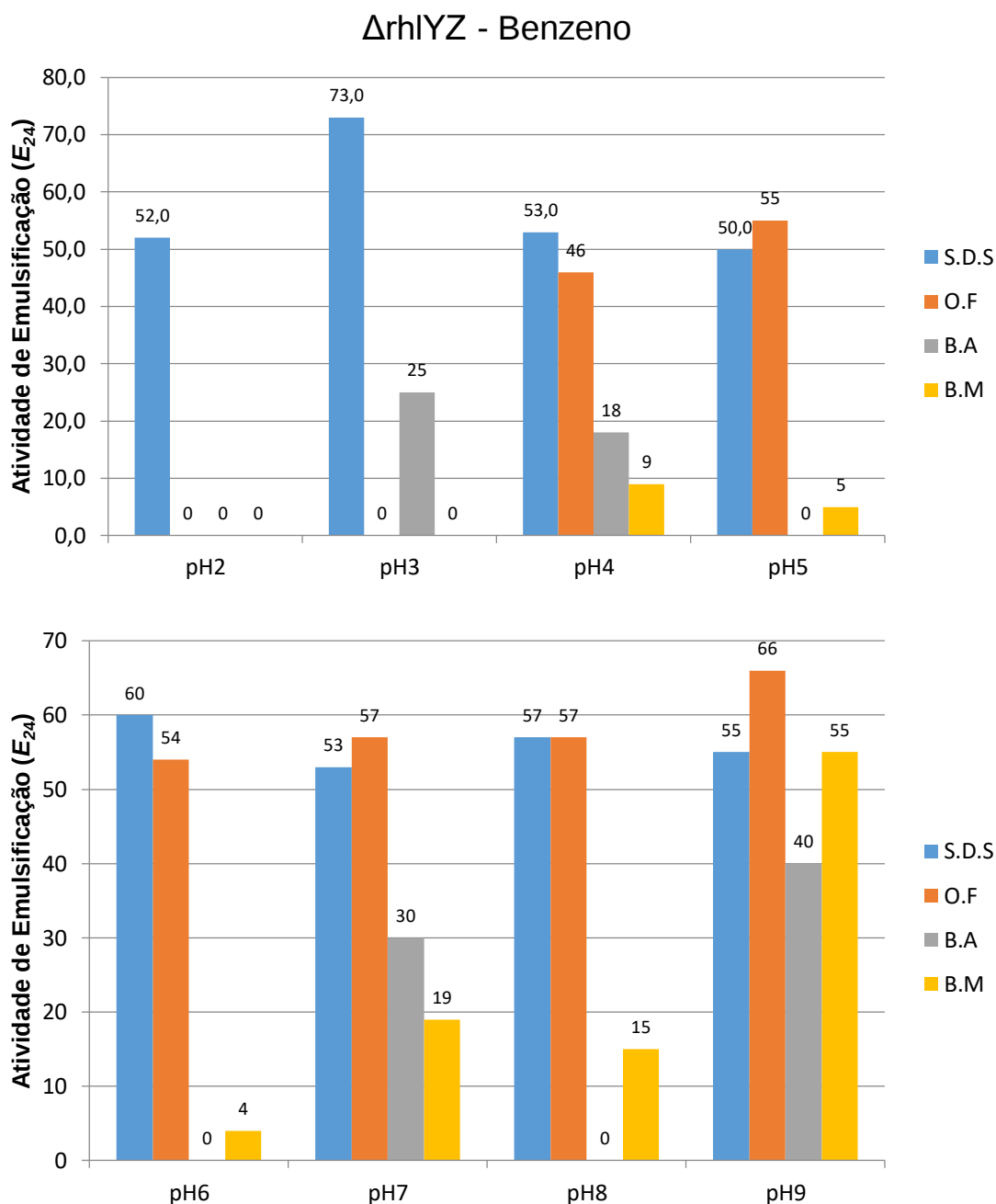
Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A atividade de emulsificação contra benzeno demonstrou diferenças notáveis ao longo da faixa de pH. No pH 2 e 3 não houve emulsificação de nenhuma solução de ramnolipídios, apenas do dodecil sulfato de sódio.

A solução de ramnolipídios produzida utilizando óleo de fritura foi o que

mais obteve destaque, aparecendo no pH 4 já com atividade de emulsificação semelhante ao S.D.S, superando-o nos pHs finais. No pH 9 surge atividade de emulsificação no grupo experimental em que a fonte de carbono foi a borra de algodão, superando a atividade do S.D.S, tal tendência também foi observada no experimento com óleo de soja para cepa mutante (Fig.18).

Figura 20 – Atividade de emulsificação contra benzeno. Medições feitas a partir de 24 horas da agitação das soluções 0,1% (p/v) de ramnolipídios em diferentes pHs. Ramnolipídios produzidos pela cepa MPAO1 Δ rhIYZ.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A atividade de emulsificação com os ramnolipídios produzidos pela cepa mutante apresentou melhores resultados do que os da cepa selvagem. Novamente, observa-se que no pH 2 e 3, a atividade de emulsificação das soluções de ramnolipídios são nulas, exceto pelo grupo experimental em que a borra de algodão foi utilizada como fonte de carbono.

Uma diferença notável desse experimento é o aumento da atividade de emulsificação dos ramnolipídios produzidos a partir de borra de milho, que na selvagem não chegou aos 10 de atividade. No pH 9, os ramnolipídios derivados de todas as fontes de carbono obtiveram seu ápice em emulsificação.

No experimento de Piróllo *et al.* (2008) foi testado a emulsificação dos ramnolipídios contra diversas fontes, como petróleo bruto, óleo diesel, querosene e benzeno. A solução de ramnolipídios foi produzida usando o óleo diesel como fonte de carbono. Em todas as análises, as porcentagens de emulsificação ficaram acima de 60%, se destacando o benzeno que ficou em 100% após 24 horas da agitação. Observando o pH da solução, o caldo de ramnolipídios do óleo diesel era de 8,4, o que compactua com os resultados do presente experimento, onde o pH mais alto foi o que apresentou os melhores índices de emulsificação contra o benzeno.

Em comparação com o estudo de Pornsunthorntawee *et al.* (2008), a emulsificação contra hidrocarboneto causado pelo caldo de ramnolipídios das fontes de carbono em questão, apresentaram resultados superiores ao do caldo produzido pela cepa isolada *P. aeruginosa* SP4, usando óleo de palma como fonte de carbono. As medições para essa cepa ficaram abaixo dos 30%, enquanto dos resíduos conseguiram alcançar mais de 50% no pH 9. O que corrobora com a literatura, reforçando que a emulsificação é dependente direta da fonte de carbono empregada no processo biológico (PATEL; DESAI, 1997; COSTA *et al.*, 2006). O autor destaca que a melhor emulsificação ocorreu contra óleo de palma, devido ser a mesma fonte empregada no bioprocessamento.

5 CONCLUSÃO

Observando os resultados, é possível inferir algumas conclusões: o óleo de fritura foi a melhor fonte de carbono para produção de ramnolipídios quando comparado com a borra de algodão, borra de óleo de milho, glicerol bruto, glicerol bidestilado e melaço, sendo que para a cepa selvagem a produção é ainda maior quando comparada com a mutante. Em ambas as cepas, a maior produção ocorre em 144 horas, sendo as concentrações mais baixas apresentadas nas primeiras 48 horas.

As borras como fonte de carbono apresentaram melhor rendimento para a mutante do que a cepa selvagem. Esse fato pode estar relacionado à presença de outras moléculas de carbono não oleosas na borra, como carboidratos, favorecendo assim a síntese dos ramnolipídios via FASII e não pela β -oxidação.

Dentre as fontes hidrofílicas, em ambas as cepas, o glicerol bidestilado apresentou melhor desempenho na produção de biossurfactante do que o glicerol bruto, enquanto o melaço foi à fonte com menor rendimento entre todas as fontes estudadas no trabalho.

A biomassa das fontes hidrofílicas foi inferior nos experimentos com a cepa mutante, indicando que, os genes *rh/YZ*, também estão relacionados com a síntese de estruturas primárias. A produção de biossurfactante em ambas as cepas foram baixas em fontes hidrofílicas, não podendo afirmar que a deleção dos genes *rh/YZ* tenha influenciado a produção.

A diminuição da tensão superficial e interfacial foi promissora nas soluções de ramnolipídios produzidas pelo óleo de fritura e borra de milho, não havendo diferença significativa entre as cepas. A tensão superficial ficou abaixo dos 31 mN/m, e interfacial abaixo dos 1,4 mN/m, semelhante aos experimentos usando fontes de carbono mais tradicionais.

A concentração Micelar Crítica (CMC) apresentou estabilidade nas concentrações mais baixas das soluções derivadas da cepa mutante do que da cepa selvagem, implicando na formação de diferentes congêneres entre as cepas, mesmo utilizando a mesma fonte de carbono. A solução derivada do bioprocessamento utilizando borra de algodão foi a que diminuiu melhor a tensão em baixas concentrações, mas também foi que a manteve mais alta nas

concentrações maiores.

A melhor estabilidade de emulsificação foi observada nos pHs mais alcalinos, e derivadas da cepa mutante, tanto contra o óleo de soja quanto do benzeno, com destaque para o óleo de fritura e borra de milho, superando o detergente convencional em alguns pHs. A emulsificação foi nula nos pHs 2 e 3, em praticamente todos os testes contra benzeno.

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.
- ABALOS, A.; MAXIMO, F.; MANRESA, M. A.; BASTIDA, J. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. J. Chem. Technol. Biotechnol., n. 77, p. 777–784, 2002.
- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 86, p. 1323–1336, 2010.
- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MULLER, M.M.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation & bioengineering of production. In: SOBERON-CHAVEZ, G; STEINBUCHER, A. (ed.). Biosurfactants: From Genes to Applications. Munster: Springer, 2011. p. 280.
- ABDEL-MAWGOUD, M. A.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. A Stereospecific Pathway Diverts β -Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid. Biosurfactants Chemistry & Biology, v.21 p.156–164, 2014.
- ALCARDE, A. R. Processamento da cana-de-açúcar: outros produtos. Agência de informação EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 26 out. 2017.
- ANDRÄ, J.; RADEMANN, J.; HOWE, J.; KOCH, M.H.J.; HEINE, H.; ZÄHRINGER, U.; BRANDENBURG, K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. Biol. Chem., v. 387, p. 301–310, 2006.
- ARAUJO, L. M. Avaliação físico-química de melão e melado. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em tecnologia em produção sucroalcooleira) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- ARAUJO, L.V.; GUIMARAES, R. C.; MARQUITA, R. L. S.; SANTIAGO, V.M.J.; SOUZA, M.P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D.M.F. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. Food Control, v.63, p. 171-178, 2016.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl. Environ. Microbiol., v. 45, p. 162-168, 1996.

BALIEIRO, G.O.T. Produção de Biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 a partir de glicerol residual proveniente da produção de biodiesel. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.

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

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol., Oxford, v. 53, p. 495-508, 2000.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. Journal of Food Engineering. Oxford: Elsevier B.V., 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.

BENINCASA, M.; ACCORSINI, F.R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. Biores. Technol., Essex, v. 99, p. 3843-3849, 2008.

BURGER, M.M.; GLASER, L.; BURTON, R.M. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. v. 238, p. 2595–2602, 1963.

CALFEE, M. W.; SHELTON, J. G.; MCCUBREY, J. A.; PESCI, E. C. Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa* produced surfactant. Infection and immunity, p.878–882, 2005.

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

CECCATO, H. D. Produção e aplicação de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1. 2013. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

CHAMPION, J.T.; GILKEY, J.C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R.M. Electron Microscopy of rhamnolipids (biosurfactant) morphology: effect of pH, cádmium and octadecane. J. Colloid Interface Sci., v. 170, p. 569-574, 1995.

CHANG, J.S.; CHOU, C.L.; LIN, G.H.; SHEU, S.Y.; CHEN, W.M.

Pseudoxanthomonas kaohsiungensis, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. Syst. and Appl. Microbiol., Stuttgart, v. 28, n. 2, p. 137-144, 2005.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. Process Biochemistry, Londres, v.41, n.2, p.483-488, 2006.

COHEN, R.; EXEROWA, D. Surface forces and properties of foam films from rhamnolipid biosurfactants. Adv. Colloid Interface Sci., v.134–135, p. 24–34, 2007.

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

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

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

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

DOWD, M.K. Gas chromatographic characterization of soapstocks from vegetable oil refining. J. Chromatogr. A, v. 816, p. 185-193, 1998.

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

DUBEAU, D.; DÉZIEL, E.; WOODS, D.; LÉPINE, F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. BMC Microbiol., v. 9, n. 263, p. 1–12, 2009.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and crud whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. World J. Microbiol. Biotechnol., n. 17, p. 61–69, 2001.

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

FRÉ, N. C. Obtenção de Ácidos Graxos a partir da acidulação de borra de

neutralização de óleo de soja. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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

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. 1061–1068, 2010.

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

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

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

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

GUTIERREZ, L. E.; SILVA, R. C. M. Fatty acid composition of cane molasses and yeasts. Sci. Agric., n.3, v.50, p. 473-477, 1993.

HAAS, M. J. Improving the economics of biodiesel production through the use low value lipids as feedstock: vegetable oils soapstock, Fuel Processing Technology, v. 86, p. 1087-1096, 2005.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol., n. 88, p. 379–387, 2000.

HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. Biotechnol. Bioeng., n. 81, p. 316–322, 2003.

HAN, F.; HE, X.; HUANG, J.; LI, Z.; WANG, Y.; FU, H. Surface Properties and Aggregates in the Mixed Systems of Bolaamphiphiles and TheirOppositely Charged Conventional Surfactants. J. Phys. Chem. B., v. 108, p. 5256-5262,

2004.

HENKEL, M.; GEISSLER, M.; WEGGENMANN, F.; HAUSMANN, R. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. Biotechnology Journal, v.12, n.7, 2017.

HENNING, S.B.; SANTOS, P.M.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J.; LOSCHAGIN, P.E. Factors affecting rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Res. J. Biotechnol., v. 3, n. 1, p. 45-49, 2008.

HORI, K.; ICHINOHE, R.; UNNO, H.; MARSUDI, S. Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. Biochem. Eng. J., v. 53, n. 2, p. 196–202, 2011.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. Letters in Appl. Microbiol., v. 21, p. 176-179, 1995.

ISHIGAMI, Y.; GAMA, H.; ISHI, F.; CHOI, Y.K. Colloid Chemical Effect of Polar Head Moieties of a Rhamnolipid-Type Biosurfactant. Langmuir, v. 9, p. 1634-1636, 1993.

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

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

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

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

KITAMOTO, D.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. Current Opinion in Colloid & Interface Science., v. 14, p. 315-328, 2009.

KOCK, J.L.F.; BOTHA, A.; BLERH, J.; NIGAM, S. Used cooking oil: science tackles a potential health hazard. Journal of Science, South African, v. 50, p. 513–514, 1996.

- KÖHLER, T.; CURTY, L.K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHÈRE, J.C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol., Washington, v. 182, p. 5990-5996, 2000.
- KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. J. Biosci. Bioeng., v. 107, n. 3, p. 240–245, 2009.
- LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: Biosurfactants and Biotechnology; Kosaric, N., Cairns, W. L. Eds.; Marcel Dekker: New York, 1987; p 21- 45.
- LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol, v. 51, p. 22-32, 1999.
- LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S.S.G.V.A.O.; GONÇALVES, L. A.G.; CONTIERO, J. Effect of C/N ratio and physicochemical conditions on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Libyan Agriculture Research Center Journal International, v.1, p.85-92, 2010.
- LOVAGLIO, R. B. Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2011. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011a.
- LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JUNIOR, M. J.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.85 p.301–305, 2011b.
- LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. Biotechnology Advances, v, 33, p. 1715-1726, 2015.
- MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 63, n.1, p. 21–53, 1999.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol, v.58, n.4, p.428-434, 2002.
- MANRESA, A.; BATISDA, J.; MERCADÉ, M.E.; ROBERT, M.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M.J.; GUINEA, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Society Ind. Microbiol. Amsterdam, v. 8, p. 133-136, 1991.
- MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and

opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, v.30, n.11, p.558-564, 2012.

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

MCGINLEY, M., MOTT, J., 2008. Bioethanol Production Monitoring using IonExclusion HPLC with RezexTMROA Column. Phenomenex Application Note TN-1043. Phenomenex, Inc., Torrance. (accessed 20.10.19)
https://www.brechbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/services/app-support/tech-chem_and_packaging/TN1043_bioethanol_monitoring_using_Rezex_ROA_LC.pdf.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agroindustrial byproducts for biosurfactant production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v.71, p.61-64, 1994.

MESQUITA, A. C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. 2004. 108f. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MEZAROBÁ, S.; MENEGUETTI, C. C. GROFF, A. M. Processos de produção do açúcar de cana e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL, 7., 2010, Campo Mourão-PR, novembro de 2010.

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D.J.; WANG, W.; XIU, Z.L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.* v.28, n.21, p.1755-9, 2006.

MURUAGA, M. L.; CARVALHO, K. G.; DOMÍNGUEZ, J.M.; de SOUZA OLIVEIRA, R. P.; PEROTTI, N. Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. *Renew. Energy*, v. 85, p. 649-656, 2016.

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

MULLER, M. M.; HORMANN, B.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Applied Microbiol. and Biotechnol.*, v.87, p.167–174, 2010.

MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids – next generation surfactants?. *J. Biotechnol.* v. 162, n. 4, p. 366–380, 2012.

MULLIGAN, C.N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of

phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., v. 12, p. 199-210, 1989.

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

NAYAK, A.S.; VIJAYKUMAR, M.H.; KAREGOUDAR, T.B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp PNK-04 and its application in bioremediation. Int. Biodeterior. Biodegrad., v. 63, p. 73–79, 2009.

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

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

NOGUEIRA, M. R. Produção de poli-(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] a partir de melão por *Burkholderia mimosarum* MA18. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

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

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

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

PALANISAMY, P., RAICHUR, A.M. Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique. Mater. Sci. Eng., v, 29, p. 199–204, 2009.

PARK, J.; KIM, D. K.; WANG, Z. M.; LEE, J. P.; PARK, S. C.; LEE, J. S. Production of biodiesel from soapstock using an ion exchange resin catalyst. K. J. Chem. Eng, v. 25, n. 6, p.1300-1354, 2008.

PARRA, J.L.; GUINEA, J.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; COMELLES, F.; BOSH, M.P. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. J. Am. Oil Soc., v. 66, p. 141–145, 1989.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letters in Applied Microbiology, v. 25, p. 91-94, 1997.

PATHANIA, A. S.; JANA, A. K. Improvement in Production of Rhamnolipids Using Fried Oil with Hydrophilic Co-substrate by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* NJ2 and Characterizations. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.191, p. 1223-1246, 2020.

PAULA, F. C.; KAKAZU, S.; PAULA, C. B. C.; GOMEZ, J. G. C.; CONTIERO, J. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandora sp.* Journal of King Saud University, v. 29, n. 2, p. 166-173, 2017.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L.; RAO, H. S. P.; VIJJAPU, S. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* (VCRC B426). Acta Tropica, v. 148, p 24-31, 2015.

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

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

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

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. Colloid Surf. B-Biointerfaces, v.72, p. 6–1, 2009.

PORTIN, Y. K. F.; SGORLON, J. G.; GOMES, M. C. S.; SUZUKI, R. M.; MENEZES, M. L. Comparação de métodos de extração de ácidos graxos da bora obtida na neutralização do óleo de milho visando reaproveitamento. Scientia Cum Industria, v.4, n.2, p. 92-97, 2016.

RAHIM, R.; OCHSNER, U.A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERON-CHA VEZ, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhIC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. Mol. Microbiol. v. 40, p. 708–718, 2001.

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

petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresource Technology, v.90, p.159–168, 2003.

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

RANDHAWA, K.K.S.; RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipids biosurfactants – past, presente and future scenario of global market. Front. Microbiol., v. 5, artigo 454, 2014.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. Biodegradation, v. 18, n. 1, p. 115–121, 2006.

RAZA, Z.A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. Int. Biodeterior. Biodegradation, v.126, p. 45-56. 2017.

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

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

ROONEY, A.P.; PRICE, N.P.; RAY, K.J.; KUO, T.M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. FEMS Microbiol. Lett., v. 295, p. 82–87, 2009.

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

RUIZ-MÉNDEZ M. V.; MARMESAT, S.; LIOTTA, A.; DOBARGANES, M. C. Analysis of used frying fats for biodiesel production. Grasas Aceites, v.59, p. 45–50, 2008.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F.J.; ESPUNY, M.J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J.A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. J. Colloid Interface Sci., v. 307, p. 246–253, 2007.

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

- SANTOS, V. L.; NARDI-DRUMMOND, R. M.; DIAS-SOUZA, M. V. Biosurfactants as Antimicrobial and Antibiofilm Agents. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, p.371–402, 2017
- 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.
- SHA, R.; JIANG, L.; MENG, Q.; ZHANG G.; SONG, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. Journal of Basic Microbiology, v.52, p.458 – 466, 2012.
- SHEPPARD, J. D.; COPPER, D. G. The effect of biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. J.Chem. Technol. Biotechnol., Oxford, v. 48, p. 325-336, 1990.
- SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnol.Adv., v.27, p.30–39, 2009.
- SILVA, V. L. Estudo dos micronutrientes na produção de ramnolipídios por mutante de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2011.45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.
- SILVA, V. L. Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em biorreator. 2014.Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.
- SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R.B.; VON ZUBEN, C.J.; CONTIERO, J. Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*?. Front. Microbiol, v. 06, 2015.
- SILVA, V. L. Estudo do metabolismo dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Tese (Doutorado em microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2018.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends in Biotechnol. Amsterdam, v. 22, n. 3, p.142-146, 2004.
- SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (Timmis, K.N., ed.), p. 3687–3704, Springer–Verlag, 2010a.
- SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (Timmis, K.N., ed.), p. 3705–3723, Springer–Verlag, 2010b.

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

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

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research. New York.pp. p. 200-230, 1995.

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

SURYANTI, V.; MARLIYANA, S.D.; WULANDARI, A. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* growing on molasses and its application. In: International Conference of Chemical and Material Engineering (ICCME), 2005, American Institute of Physics, 2005. 040003-040001–040003-040006.

SWERN, D. Refining and Bleaching In: SWERN, D. Bailey`s Industrial Oil and Fat Products. 4. ed. New York, 1982. p. 253-314.

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

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

TAN, Y. N.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources. Microbial Cell Factories, n.1, v. 17, 2018.

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.

TREEPONG, P.; KOS, V.N.; GUYEUX, C. et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin. Microbiol Infect, v.23, n.3, p. 258-266, 2017.

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

VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA, V. Biosurfactant production by Antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp during growth on hydrocarbons. Curr. Microbiol., v. 54, p. 136–141, 2007.

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

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

VENKATESH, N. Y. M.; VEDARAMAN N. Remediation of soil contaminated with copper using Rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil. Ann. Microbiol., v.62, p.85-91, 2012.

VIEITEZ, I.; CALLEJAS, N.; IRIGARAY, B.; PINCHAK, Y.; MERLINSKI, N.; JACHMANIÁN, I.; GROMPONE, M. A. Acid Value, Polar Compounds and Polymers as Determinants of the Efficient Conversion of Waste Frying Oils to Biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 91, n.4, p. 655–664, 2014.

VILLENEUVE, M.; IKEDA, N.; MOTOMURA, K.; ARTONO, M. Miscibility of Butanol and Cationic Surfactant in the Adsorbed Film and Micelle. J. Colloid and Interface Sci., v. 208, p. 388-398, 1998.

VINSON, P.K.; TALMON, Y.; WALTER, A. Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octylglucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy. Biophys. J., v. 56, p. 669-681, 1989.

VIPULANANDAN, C.; REN, X. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. J. Environ. Eng., n. 126, p. 629–634, 2002.

WANG, Z.; LEE, J.; PARK, J.; WU, C.; YUAN, Z. Novel Biodiesel production technology from soybean soapstock, K. J. Chem. Eng., v. 24, n. 6, p.1027 – 1030, 2007.

WANG, S.; MULLIGAN, C. N. Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant. Appl. Geochem., v.24, p.928-935, 2009.

WANG, Q.; TAPPEL, R.C.; ZHU, C.; NOMURA, C.T. Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. Appl. Environ. Microbiol. v. 78, n. 2, p. 519–527, 2012.

WINSOR, G.L.; LAM, D.K.; FLEMING, L.; LO, R.; WHITESIDE, M.D.; YU, N.Y.; HANCOCK, R.E.; BRINKMAN, F.S. *Pseudomonas* Genome Database:

improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. Nucleic Acids Res. 39 (Database issue), D596– D600, 2011.

YOSHIMURA, I. Produção de rhamnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glycerol residual e abordagem da evolução adaptativa. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências da Natureza, Buri, 2019.

ZHANG, Q.; JU, L.K. Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of β -glucosidase from cellulase enzyme mixture. Enzyme Microbial Technol., v. 48, p. 175–80, 2012.

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

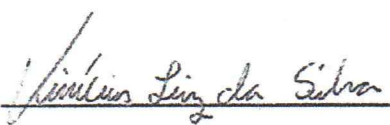
ZHONG, H.; JIANG, Y.; ZENG, G.; LIU, Z.; LIU, L.; LIU, Y.; YANG, X.; LAI, M.; HE, Y. Effect of low-concentration rhamnolipid on adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 on hydrophilic and hydrophobic surfaces. Journal of Hazardous Materials, v. 285, p. 383-388, 2015.

ZHU, K.; ROCK, C.O. RhlA converts b-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. v. 190, p. 3147–3154, 2008.

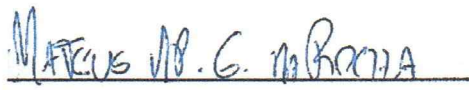
ZULIANELLO, L.; CANARD, C.; KÖHLER, T.; CAILLE, D.; LACROIX, J.; MEDA, P. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary 167 Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and immunity, p. 3134–3147, 2006.



Prof. Dr. Jonas Contiero
Orientador



Dr. Vinícius Luiz da Silva
Co-orientador



Mateus Aparecido Gonçalves da Rocha
Aluno

Rio Claro - 2020