
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TULIO DE LUCCA CAPELINI

**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR
LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa*
EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E
CONDIÇÕES DE CULTIVO**



Rio Claro
2009

TULIO DE LUCCA CAPELINI

Produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*
em diferentes fontes de carbono e condições de cultivo

Orientador: Jonas Contiero

Co-orientador: Roberta Barros Lovaglio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
bacharel.

Rio Claro
2009

576
C238p Capelini, Tulio de Lucca
 Produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*
 em diferentes fontes de carbono e condições de cultivo / Tulio de Lucca
 Capelini. - Rio Claro : [s.n.], 2009
 27 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

 1. Microorganismos. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Ramnolipídios. 4.
 Fontes de carbono. 5. Biossurfactante. I. Título.

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

SUMÁRIO

Página

1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Surfactantes	6
3.2. Biossurfactantes e ramnolipídios	6
3.3. Padrões de produção de biossurfactantes	7
3.4. Aplicação comercial dos biossurfactantes	8
3.5. Fontes de carbono alternativas na produção de biossurfactantes	9
4. Objetivos	10
4.1. Objetivo Geral	10
4.2. Objetivos Específicos	10
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
5.1. Microrganismos.....	11
5.2. Meio de cultura e condições de cultivo	11
5.2.1. Meio de cultura para teste de produção de biossurfactantes	11
5.2.2. Fontes de carbono	11
5.2.3. Preparo do pré-inóculo e condições de cultivo	12
5.3. Métodos analíticos.....	12
5.3.1. Determinação da concentração de biomassa	12
5.3.2. Determinação da tensão superficial e pH	12
5.3.3. Determinação da concentração de ramnose	12
5.3.4. Determinação da aderência bacteriana (BATH)	13
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6.1 Ensaios fermentativos com óleo de fritura usado à concentração de 4% (p/v)	14
6.2. Ensaios fermentativos com glicerol à concentração de 4% (p/v)	16
6.3. Ensaios fermentativos com <i>n</i> -parafina à concentração de 4% (p/v).....	19
6.4. Ensaios fermentativos do consórcio das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> que melhor produziram ramnolipídios em óleo de fritura usado nas concentrações de 2 e 4% (p/v)	21
6.5. Ensaios fermentativos do consórcio das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> que melhor produziram ramnolipídios em glicerol nas concentrações de 2 e 4% (p/v)	23

6.6. Ensaio fermentativo do consórcio das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> que melhor produziram ramnolipídios em <i>n</i> -parafina nas concentrações de 2 e 4% (p/v)	25
6.7. Ensaio fermentativo com adição de 2% (p/v) de uma solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios às concentrações de 2 e 4% (p/v) de óleo de fritura usado	26
6.8. Ensaio fermentativo com adição de 2% (p/v) de uma solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios às concentrações de 2 e 4% (p/v) de glicerol	31
6.9. Ensaio fermentativo com adição de 2% (p/v) de uma solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios às concentrações de 2 e 4% (p/v) de <i>n</i> -parafina	35
6.10. Ensaio fermentativo com uma mistura de óleo de fritura usado e glicerol (1:1) às concentrações de 2 e 4% (p/v).....	40
6.11. Aderência bacteriana através do método de BATH (Bacterial Adherence To Hydrocarbon).....	44
7. CONCLUSÕES	46
8. REFERÊNCIAS	47

1. RESUMO

Os biossurfactantes, moléculas tenso-ativas sintetizadas por microrganismos, apresentam propriedades biológicas e superficiais que podem ser aplicadas a processos industriais diversos.

Apesar das vantagens apresentadas, não são amplamente utilizados pela indústria, devido ao alto custo de produção, baixa produtividade e uso de substratos caros.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por sintetizarem ramnolipídios, moléculas tenso-ativas promissoras em termos de produção industrial, por apresentarem excelentes propriedades tenso-ativas, além de características físico-químicas e biológicas que permitem a obtenção em concentrações superiores a outros biossurfactantes. O uso de substratos alternativos seria uma estratégia que facilitaria o desenvolvimento industrial de sua produção.

A proposta deste trabalho é dar continuidade ao estudo da produção de ramnolipídios a partir de substratos não-convencionais (n-parafina, óleos vegetais utilizados em frituras, glicerol) por isolados de *P. aeruginosa*.

2. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos sintetizados por microrganismos, que, devido a sua atividade de superfície, possuem diversas aplicações como biorremediação de ambientes poluídos por petróleo, óleo e derivados, produção de fármacos, detergentes, emulsificantes, lubrificantes, recuperação terciária de petróleo, entre outras. Apesar disso, problemas como a utilização de substratos caros e baixo rendimento, resultam numa diminuição de suas aplicações industriais e uma estratégia na tentativa de driblar estes problemas seria o uso de fontes renováveis de baixo custo que resultariam em superprodução destas moléculas.

Pseudomonas aeruginosa é capaz de sintetizar biossurfactantes denominados ramnolipídios, promissores em termos de produção e aplicação industrial. Sua produção pode ocorrer utilizando fontes de carbono tanto hidrofóbicas como os óleos vegetais e resíduos (borra) do refino destes, óleo vegetal usado em fritura de alimentos, resíduos agro-industriais, alguns hidrocarbonetos do petróleo, etc., quanto, fontes de carbono hidrofílicas como melaço de cana, glicerol, glicose, manitol e etanol, entre outras.

O Brasil possui uma grande quantidade de resíduos resultantes do consumo de óleo de fritura, principalmente óleo de soja; e, grande quantidade de glicerol gerada na produção de biodiesel devido a crescente demanda deste último com a implantação da Lei Federal 11.097/2005. E estudos indicam que o petróleo encontrado no pré-sal possui grande quantidade de parafina, e esta é prejudicial à indústria do petróleo durante as etapas de produção, movimentação e tratamento, o qual se deposita nos dutos submarinos, nos equipamentos de superfície, na coluna de produção podendo provocar significativas e crescentes perdas de petróleo. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar a potencialidade do uso destas fontes renováveis: óleo vegetal usado em fritura, glicerol e *n*-parafina (mistura de frações de C_{12} , C_{13} e C_{14}), que apresentam grande potencial para o crescimento e transformação microbiana, como fontes de carbono alternativas na produção de biossurfactantes (ramnolipídios) por linhagens de *P. aeruginosa*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Surfactantes

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

Devido a essa característica molecular, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, interfaces óleo/água ou ar/água, formando um filme molecular ordenado, diminuindo a tensão superficial e interfacial. A eficiência dos surfactantes pode ser medida através da sua capacidade de diminuir a tensão superficial, que é a quantificação da energia livre da superfície por unidade de área necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (ROSEN, 1978 apud MULLIGAN, 2005).

3.2. Biossurfactantes e ramnolipídios

Biossurfactantes, por sua vez, são metabólitos sintetizados por diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos; empregado o cultivo em condições aeróbicas em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou mistura destes. Os surfactantes sintéticos são usualmente classificados de acordo com o grupo polar, entretanto os biossurfactantes são diferenciados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes de biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; BANAT, 1997).

P. aeruginosa é uma bactéria que pode ser isolada de diferentes habitats, como águas, solos e plantas, mas podem também serem encontradas em humanos como uma patogenicidade oportunista. Esta bactéria é capaz de produzir um biossurfactante da classe dos glicolipídios, chamado de ramnolipídios, que contém uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou

duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (Figura 1) (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005). Entre as vantagens dos ramnolipídios, pode-se destacar seu fácil isolamento da cultura, uma vez que se trata de um exo-biossurfactante (MATA-SANDOVAL; KARNS; TORRENTS, 1999).

Um dos papéis fisiológicos dos surfactantes está relacionado com uma pseudo-solubilização de substratos imiscíveis convertidos em pequenas gotículas, o que é permitido pela diminuição da tensão superficial do meio ao redor, tornando o substrato rapidamente disponível ao metabolismo celular (KOSARIC; CAIRNS, 1987).

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

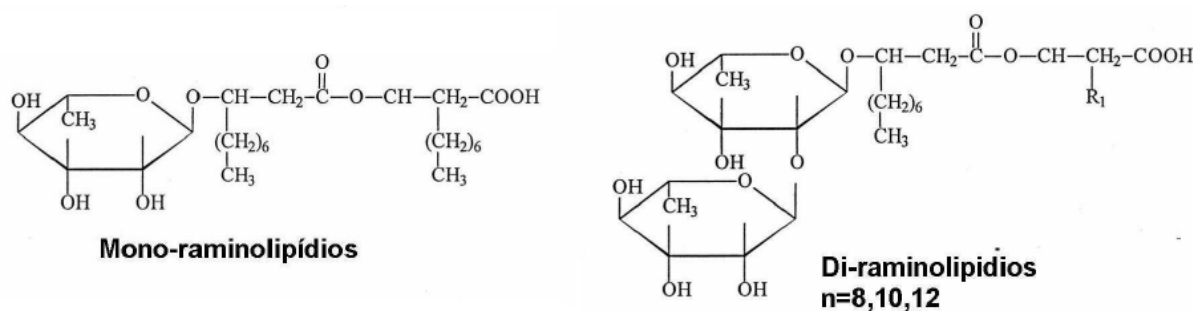


Figura 1: Estrutura molecular geral de moléculas de mono e di-ramnolipídios

3.3. Padrões de produção de biossurfactantes

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

3.4. Aplicação comercial dos biossurfactantes

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

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

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

Na agricultura os ramnolipídios possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos (Abalos et al., 2001). Os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* são utilizados como antibióticos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Indústrias de cosméticos e de medicamentos utilizam biossurfactantes como agentes emulsionantes e solubilizadores. Repelentes de insetos, pastas dentais, produtos anticaspa e desodorantes são alguns exemplos de produtos que incluem surfactantes em suas fórmulas (MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

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

encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras.

3.5. Fontes de carbono alternativas na produção de biossurfactantes

Segundo Mukherjee et al. (2006), cerca de 10 a 30 % do custo de produção de biossurfactantes é referente à matéria prima utilizada, assim uma maneira de se diminuir os custos de produção seria a utilização de substratos alternativos de baixo custo. Um dos substratos alternativos mais utilizados atualmente são os óleos vegetais e resíduos (borra) do refino destes. No Brasil, há uma grande produção e utilização destes óleos, principalmente óleo de soja, gerando um volume muito grande resíduos, tornado-se um campo promissor para a produção de ramnolipídios.

Costa et al. (2006) utilizaram óleos nativos do Brasil, como buriti, cupuaçu, maracujá, andiroba, castanha-do-Brasil e babaçu, em seus cultivos, como fontes de carbono na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI e observaram que todas as fontes apresentaram potencial, principalmente o óleo de castanha do Brasil (9.900,0 mg/L). Haba et al. (2000) verificaram a potencialidade do uso de óleos usados em fritura de alimentos (de oliva e girassol) como fonte de carbono na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* 47T2 NCIB 400044, observando produção de 2.700,0 mg/L.

Pseudomonas aeruginosa também é capaz de sintetizar ramnolipídios utilizando glicerol (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2005), embora em pequena quantidade se a mesma é comparada à quantidade gerada quando utiliza se substratos hidrofóbicos.

Itoh et al. (1971) verificaram a produção de ramnolipídios pelas linhagens de *P. aeruginosa* KY 4025, KY 3977, KY 3997 e I-85, utilizando *n*-parafina (mistura de frações de C₁₂, C₁₃ e C₁₄) numa concentração de 10% como única fonte de carbono, obtendo 8.500,0 mg/L de ramnolipídios para a linhagem KY 4025.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a potencialidade do uso de *n*-parafina, óleos vegetais utilizados em frituras e glicerol na produção de biossurfactante (ramnolipídios), além da capacidade da aderência bacteriana, por diferentes isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, obtidas no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências desta Universidade.

4.2. Objetivos Específicos

- Verificar a potencialidade do uso de *n*-parafina, óleos vegetais utilizados em frituras e glicerol na produção de ramnolipídios, pelas linhagens de *P. aeruginosa*.
- Verificar a potencialidade do uso de consórcio entre as linhagens de *P. aeruginosa*, que apresentaram maior produção de ramnolipídios, utilizando como fonte de carbono *n*-parafina, mistura de óleos usados e glicerol.
- Verificar o efeito da adição de ramnolipídios no meio de cultivo nos substratos propostos, mediante o crescimento celular e produção de ramnolipídios, pelas linhagens de *P. aeruginosa*.
- Verificar potencialidade do uso da mistura de fontes de carbono na produção de ramnolipídios, pelas linhagens de *P. aeruginosa*.
- Verificar a aderência bacteriana empregando do método de BATH (Bacterial Adherence To Hydrocarbon).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Microrganismos

Foram utilizadas as linhagens de *P. aeruginosa*: LMI 6c e LMI 7a, isoladas no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Bioquímica e Microbiologia desta Universidade, e, a linhagem LBI, isolada no Laboratório de Bioquímica Industrial do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, SP.

5.2. Meio de cultura e condições de cultivo

5.2.1. Meio de cultura para teste de produção de biossurfactantes

O meio de cultura a ser utilizado para o teste de produção de biossurfactantes (ramnolipídios) será o meio salino descrito por Robert et al. (1989), composto por (g/L): NaNO_3 , 4,0; extrato de levedura, 0,1; sais de Robert, 20mL/L contendo: K_2HPO_4 , 1,0; KH_2PO_4 , 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; KCl , 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; CaCl_2 , 0,01; e solução de elementos-traço 0,05 mL/L contendo boro (0,026%), cobre (0,05%), manganês (0,05%), molibdênio (0,006%) e zinco (0,07%).

5.2.2. Fontes de carbono

As fontes de carbono utilizadas para a produção de biossurfactantes (ramnolipídios) serão: *n*-parafina, óleo usado em fritura de alimentos e glicerol. A *n*-parafina foi obtida comercialmente, o óleo usado em frituras de alimentos foi coletado no Restaurante Universitário da UNESP Rio Claro e o glicerol de uma usina de produção de biodiesel em Piracicaba, SP

5.2.3 Preparo do pré-inóculo e condições de cultivo

O preparo do pré-inóculo, inóculo e as condições de cultivo seguiram a metodologia descrita por Benincasa et al., (2002). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8 com HCl 1M e NaOH 1M. Todo o material a ser utilizado nos ensaios fermentativos será esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Os experimentos serão conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125mL e incubados em agitador tipo “shaker” a 30°C, 200 rpm por 120 horas. Em intervalos de 24 horas, foram retiradas alíquotas para análise do crescimento celular e produção de biossurfactante. As análises foram realizadas em triplicata.

5.3. Métodos analíticos

5.3.1. Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada pelo Método de Lowry de detecção de proteínas (LOWRY et al. 1951).

5.3.2. Determinação da tensão superficial e pH

A tensão superficial será medida a partir do caldo livre de células, a 25°C, segundo o método do anel de De Nöuy (ZAJIC; SEFFENS, 1984) utilizando-se um tensiômetro Krüss K12. O pH foi analisado utilizando-se um pHmetro Digimed, também a partir do caldo livre de células.

5.3.3. Determinação da concentração de ramnose

A concentração de ramnose foi determinada pelo método descrito por Chandrasekaran e Bemiller (1980) e a concentração de ramnolipídios foi calculada multiplicando a concentração de ramnose por 3,0, o que representa a correlação ramnolipídio/ramnose (ITOH et al., 1971).

5.3.4. Determinação da aderência bacteriana (BATH)

A aderência bacteriana foi determinada pelo método descrito por Zhanz e Miller (1994).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As linhagens estudadas foram capazes de assimilar a fonte de carbono e produzir ramnolipídios em todas as condições de cultivo propostas. Os resultados da cinética de produção de ramnolipídios frente às condições estudadas estão na forma de gráficos.

6.1 Ensaios fermentativos com óleo de fritura usado à concentração de 4% (p/v)

Nos ensaios fermentativos com óleo de fritura usado as linhagens de *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 2) e LMI 6c (Figura 3) foram as que alcançaram os melhores resultados, quanto à síntese de ramnolipídios com o aumento da concentração da fonte de carbono, e a linhagem LBI de *P. aeruginosa* (Figura 4) apresentou um resultado satisfatório. A linhagem LMI 7a foi a que apresentou a maior produção, seguida pela LMI 6c e por último a LBI; sendo a máxima produção de ramnolipídios de 4.001, 23 mg/L para *P. aeruginosa* LBI (Figura 4), 8.349,16 mg/L para *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 2) e 5.561, 9 mg/L para *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 3).

Quanto à conseqüente diminuição da tensão superficial, observaram-se os menores valores para linhagem LBI de 31,13 mN/m (Figura 4); seguido pela linhagem LMI 7a e LMI 6c com os respectivos valores, 31,23 mN/m (Figura 2) e 31,63 mN/m (Figura 3).

O aumento de biomassa pode ser indiretamente observado mediante a determinação do pH dos ensaios, onde o máximo valor foi atingido em todos os ensaios em 24 horas, obtendo 8,2 para *P. aeruginosa* LBI (Figura 4), 8,23 para *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 2) e 8,01 para *P. aeruginosa* 6c (Figura 3), havendo uma diminuição desses valores ao final da fermentação para 7,01, 7,33 e 7,3, respectivamente. Com relação à síntese de biomassa, as linhagens LBI (Figura 4) e LMI 7a (Figura 2) apresentaram os valores respectivos de 10,2 g/L e 8,42 g/L em 72 horas, e ao final de 8,75 g/L e 8,10 g/L. Com relação a linhagem LMI 6c (Figura 3), a síntese máxima foi observada ao decorrer de 24 horas (10,20 g/L) e ao término da fermentação com 5, 65g/L.

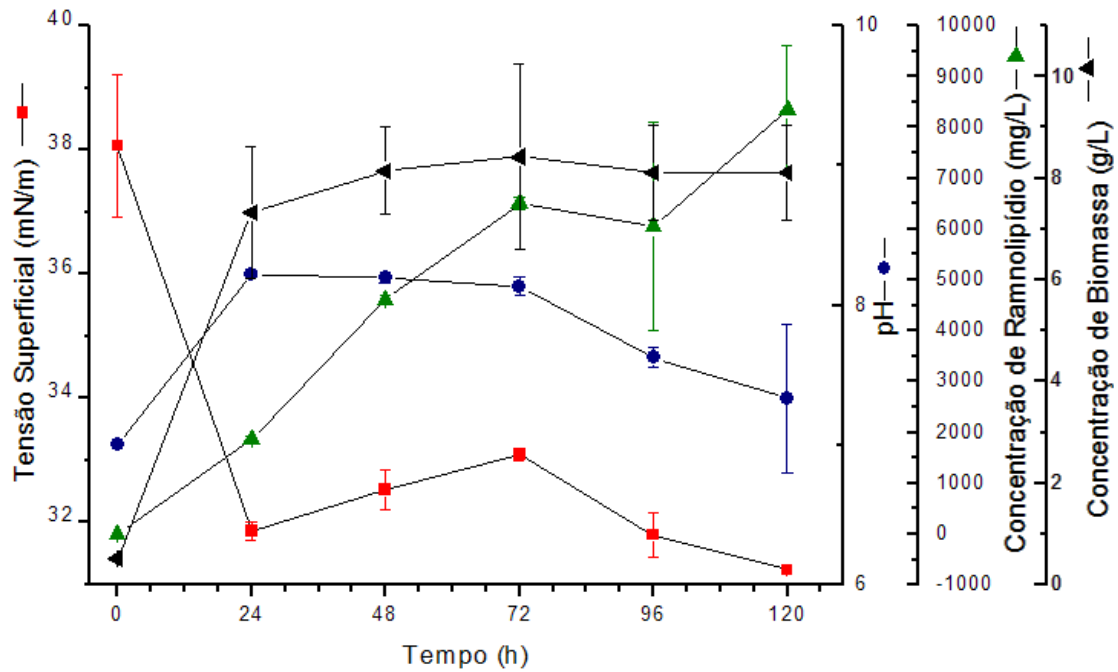


Figura 2: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em óleo de fritura usado na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

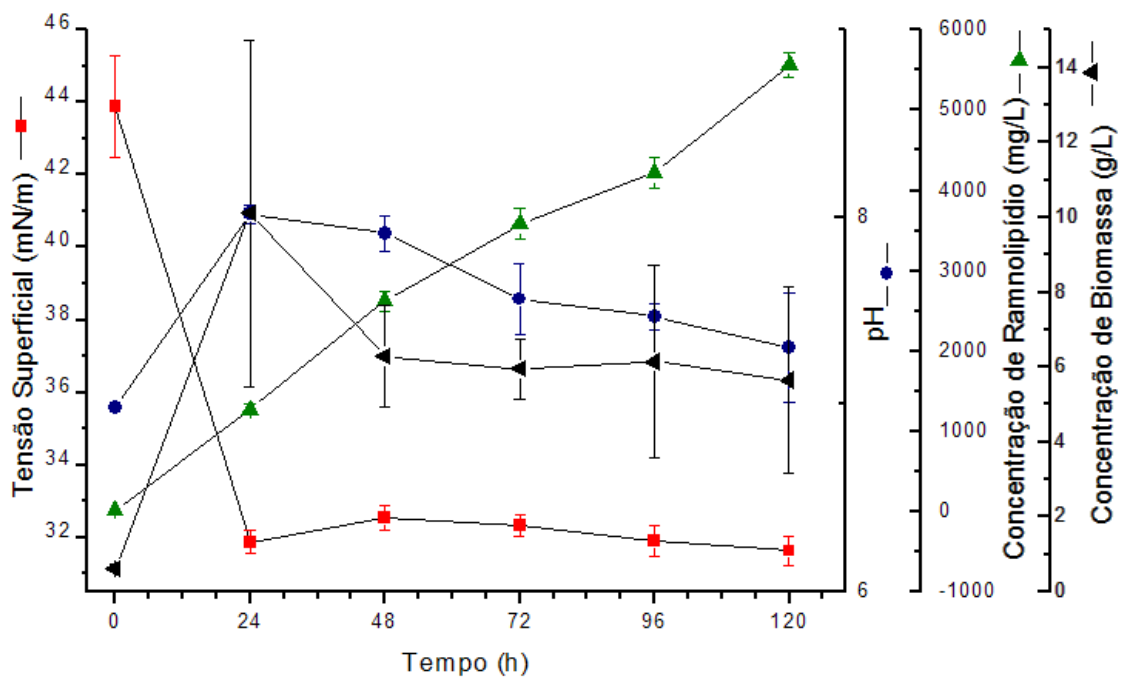


Figura 3: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em óleo de fritura usado na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

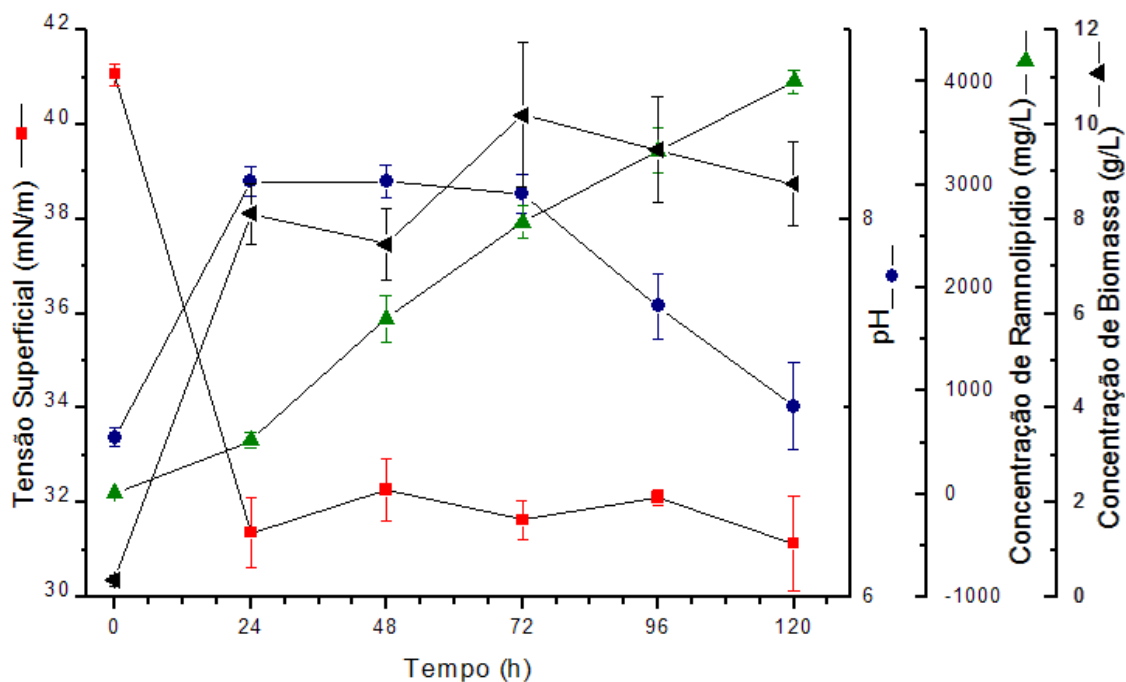


Figura 4: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em óleo de fritura usado na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

Lang e Wullbrant (1999) consideram uma condição para superprodução de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* a limitação de nitrogênio e cátions multivalentes, combinada com o excesso da fonte de carbono. Assim, esperava-se que ao aumentar a concentração de óleo contida no meio para 4% (p/v), ocorresse maior produção; porém, as concentrações de ramnolipídios obtidas frente ao meio de cultivo contendo óleo de fritura a 4%, no presente trabalho, foram de 8.349,0 mg/L para *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 2), 4.001,2 mg/L para *P. aeruginosa* LBI (Figura 4) e 5.561,9 mg/L para *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 3); inferiores as obtidas por Batista (2007), em estudos anteriores, com as mesmas bactérias à concentração de 2% (p/v) de fonte de carbono (11.277,0 mg/L para *P. aeruginosa* LBI, 9.207,0 mg/L para *P. aeruginosa* LMI 7a, e, 4.506,20 mg/L para *P. aeruginosa* LMI 6c).

6.2. Ensaios fermentativos com glicerol à concentração de 4% (p/v)

Em relação à produção de ramnolipídios, a *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 5) apresentou a maior produção, seguida pela *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 6) e *P. aeruginosa* LBI (Figura 7); obtendo os respectivos valores de 7.439,89 mg/L, 5.323,19 mg/L e 4.995,33 mg/L.

Por consequência da produção de ramnolipídios houve a diminuição da tensão superficial dos ensaios fermentativos, atingindo o valor mínimo de 30,9 mN/m para as linhagens LBI (Figura 7) e LMI 6c (Figura 6) nos respectivos tempos de 48 e 72 horas; ocorrendo um aumento desses valores para 34,2 mN/m e 34,6 mN/m, respectivamente, ao final da fermentação.

A produção de biomassa, nos ensaios com glicerol, pode ser indiretamente comprovada pela alteração do pH; uma vez que, as bactérias LMI 7a (Figura 5) e LMI 6c (Figura 6) apresentaram um pH final de 8,92 e 8,23, respectivamente; enquanto a linhagem LBI (Figura 7) apresentou seu maior valor de pH nos tempos de 72 e 96 horas (8,21 em ambos), com uma diminuição para 8,13, quando encerrada a fermentação.

Os valores de produção de biomassa, permaneceram próximos após 72 horas, cuja produção de proteína obteve os respectivos valores máximos de 6,25 g/L, 5,19 g/L e 4,67 g/L, para *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 5), *P. aeruginosa* LBI (Figura 7), *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 6).

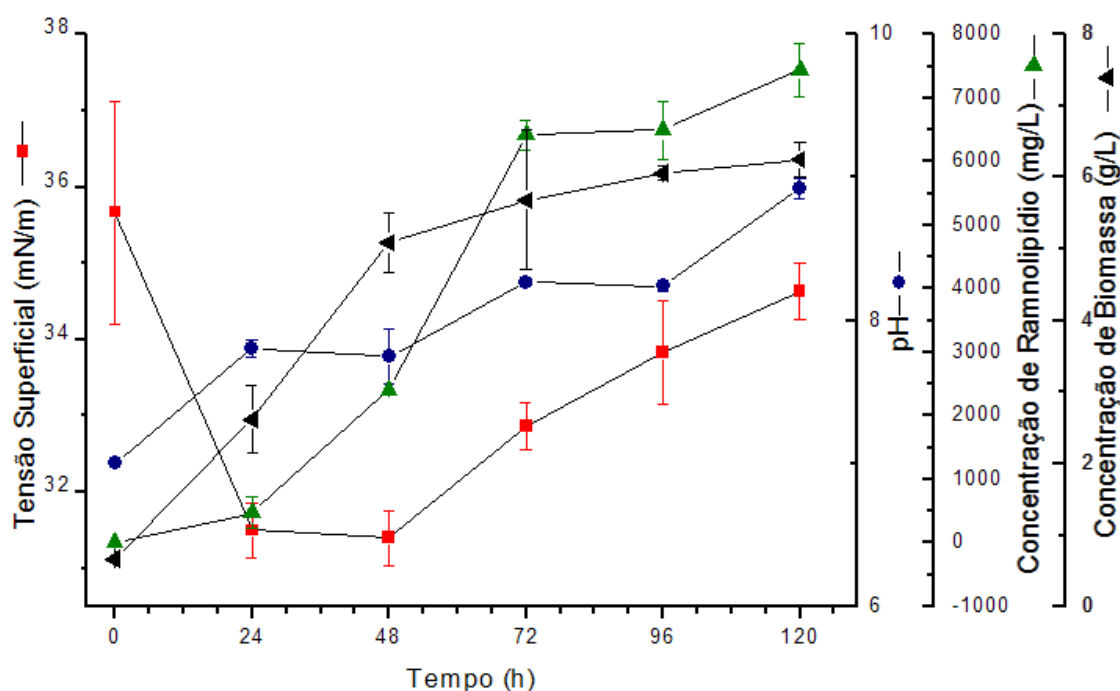


Figura 5: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em glicerol na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

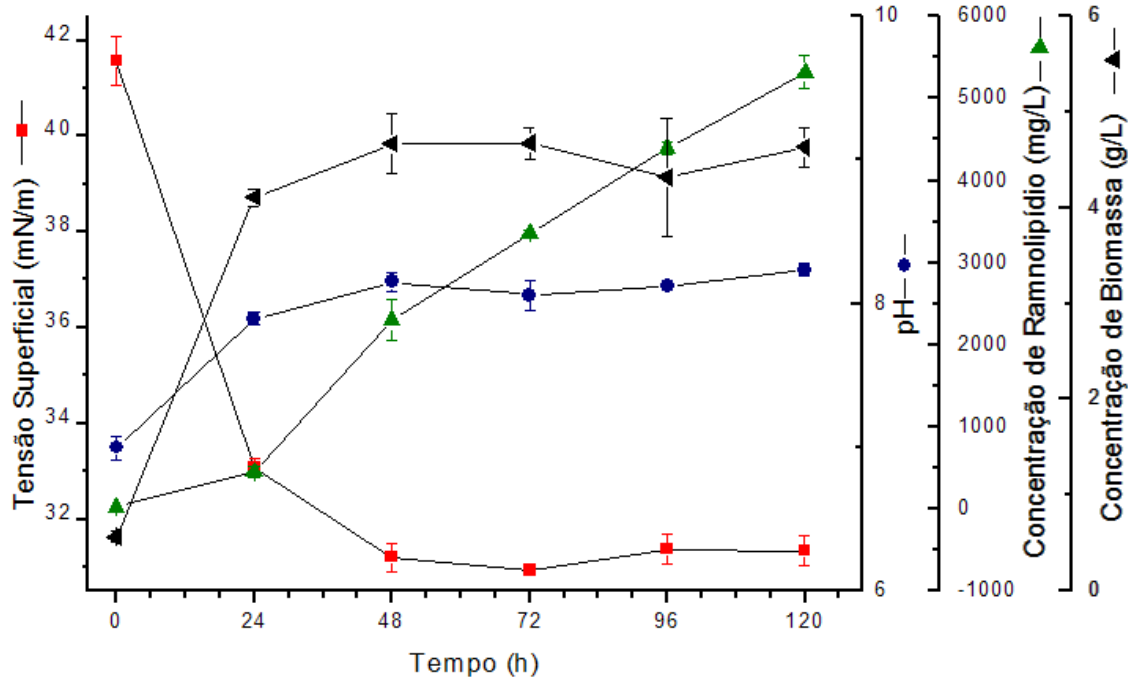


Figura 6: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em glicerol na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

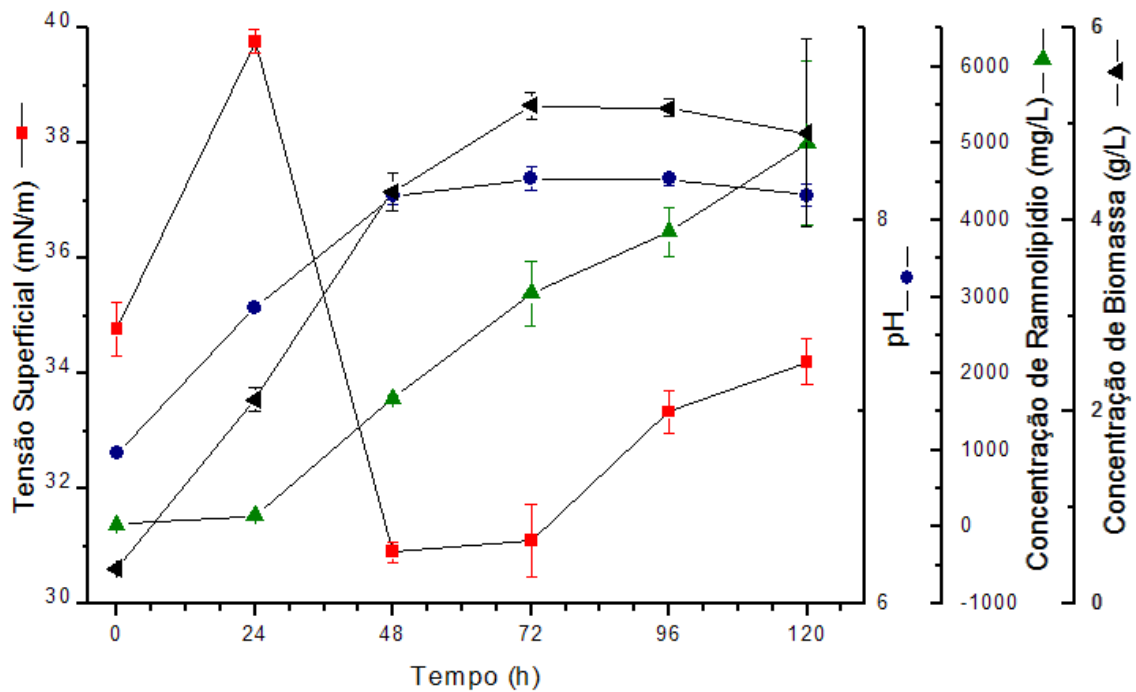


Figura 7: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em glicerol na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

No presente estudo, em uma concentração de glicerol de 4% (p/v), *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 5) produziu 7.439,89 mg/L, *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 6) produziu 5.323,19 mg/L, e, *P. aeruginosa* LBI (Figura 7) produziu 4.995,33mg/L de ramnolipídios tendo glicerol como fonte de carbono. Esses valores são superiores aos apresentados por Batista (2007) onde as mesmas linhagens produziram em uma concentração de 2% (p/v) de glicerol os seguintes valores de produção: 3.796,11 mg/L para *P. aeruginosa* LMI 7a, 3.289,17 mg/L para *P. aeruginosa* LBI e, 3.096,3 mg/L de ramnolipídios para *P. aeruginosa* LMI 6c; provando que o aumento do concentração de glicerol auxiliou a produção do biossurfactante, diferente do ocorrido com o óleo de fritura usado.

6.3. Ensaios fermentativos com *n*-parafina à concentração de 4% (p/v)

A linhagem de *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 8) foi a que apresentou a melhor produção de ramnolipídios em *n*-parafina 4% (p/v), sendo de 97, 619 mg/L, seguida das cepas LMI 7a (Figura 9) e LBI (Figura 10) com as respectivas produções de 94,053 e 89,08 mg/L. Como consequência da baixa produção, a redução da tensão superficial final foi de 34, 13 mN/m para a *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 9), 35,73 mN/m para a linhagem LMI 6c (Figura 8) e a tensão do cultivo da cepa LBI (Figura 10) foi de 37,76 mN/m.

As linhagens foram capazes de assimilar a fonte de carbono e alcançaram um crescimento de biomassa final de 2,66, 3,01 e 3,58 g/L para as respectivas linhagens LBI (Figura 10), LMI 7a (Figura 9) e LMI 6c (Figura 8). Devido ao crescimento celular ocorreu um aumento no pH dos cultivos, de 8,51 para a *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 9) e 8,53 e 8,57 para as respectivas linhagens LMI 6c (Figura 8) e LBI (Figura 10).

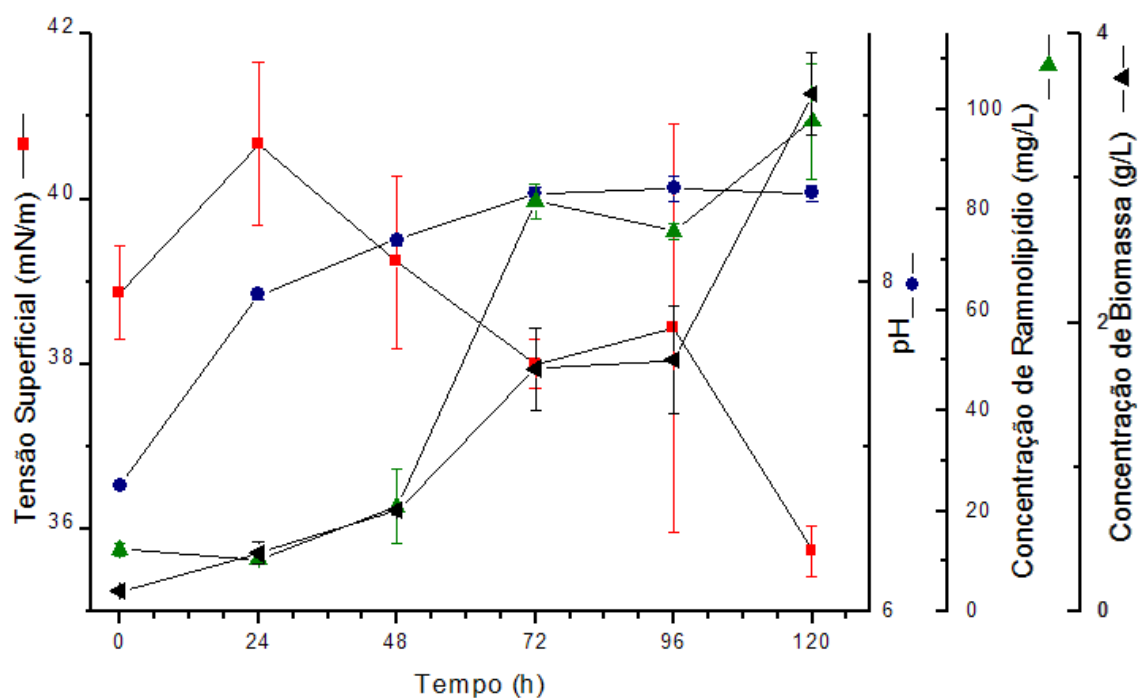


Figura 8: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em *n*-parafina na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

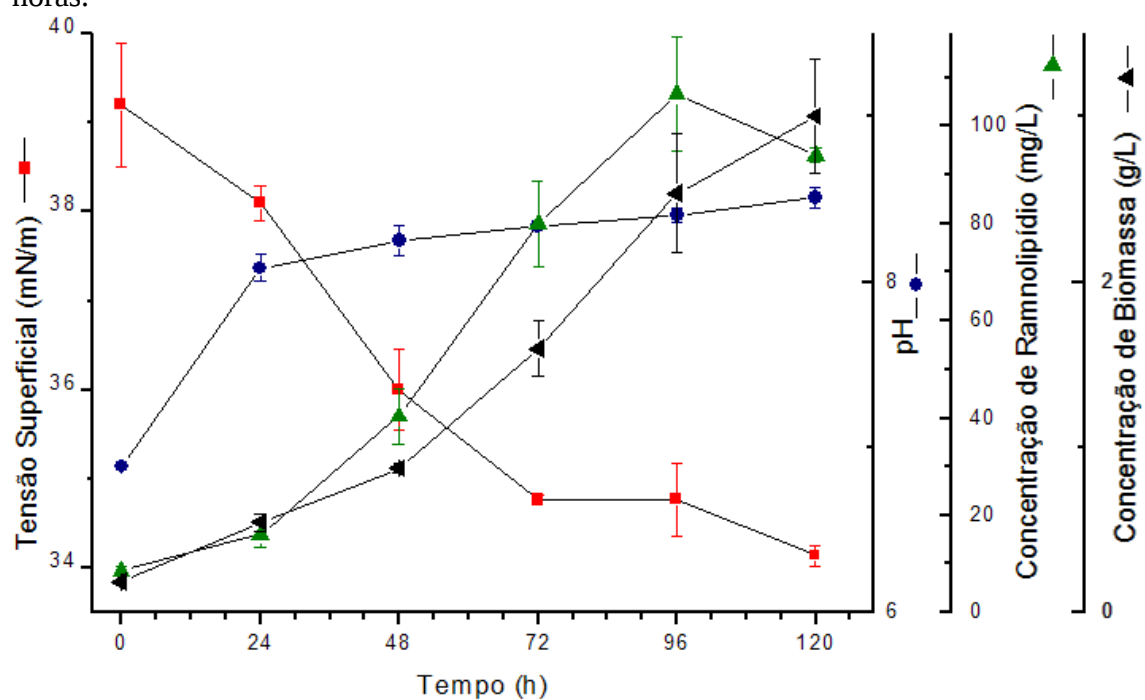


Figura 9: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em *n*-parafina na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

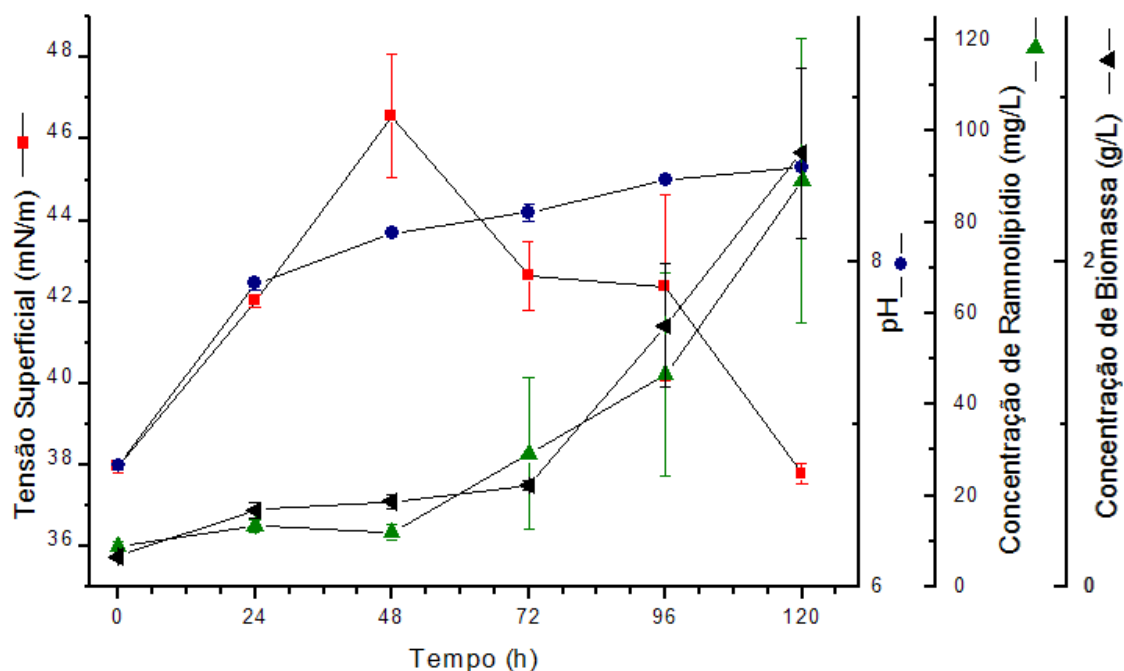


Figura 10: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em *n*-parafina na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

Como o ocorrido com o glicerol o aumento na concentração de carbono no meio auxiliou a produção de ramnolipídios. Quando cultivadas em 4% (p/v) as linhagens de *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 8), LMI 7a (Figura 9) e LBI (Figura 10) apresentaram as respectivas produções de 97,619, 94,053 e 89,08 mg/L de ramnolipídios; valores superiores ao cultivo das mesmas linhagens em *n*-parafina 2% (p/v), 90,04 mg/L para a cepa LMI 6c, 88,87 e 68,49 mg/L de ramnolipídio para as respectivas *P. aeruginosa* LMI 7a e LBI (BATISTA, 2007).

6.4. Ensaios fermentativos do consórcio das linhagens de *P. aeruginosa* que melhor produziram ramnolipídios em óleo de fritura usado nas concentrações de 2 e 4% (p/v)

O cultivo do consórcio das linhagens LBI e LMI 7a em óleo a uma concentração de 2% (p/v) (Figura 11) apresentou a produção de 6.988,6 mg/L de ramnolipídios; enquanto o cultivo em consórcio das linhagens LBI 7a e LBI 6c à 4% (p/v) (Figura 12) produziu 5.561,16 mg/L de ramnolipídios. Como consequência da produção de biotensoativos, houve diminuição da tensão superficial dos meios de cultivo para 30,2 mN/m e 32,0 mN/m, para as respectivas concentrações de 2 e 4% (p/v) (Figuras 11 e 12). O crescimento celular pode ser visualizado observando-se a mudança no meio de cultivo, que se tornou mais denso e opaco, e com coloração. Como característico do desenvolvimento de *P. aeruginosa*, o aumento no pH do meio também pode ser considerado outro indicativo de produção de biomassa; sendo que

os ensaios, ao final na fermentação, alcançaram um pH de 8,56 e 8,39, e crescimento de biomassa e 2,234 e 2,832g/L, para os respectivos cultivos em 2 e 4% (p/v) de óleo usado (Figuras 11 e 12).

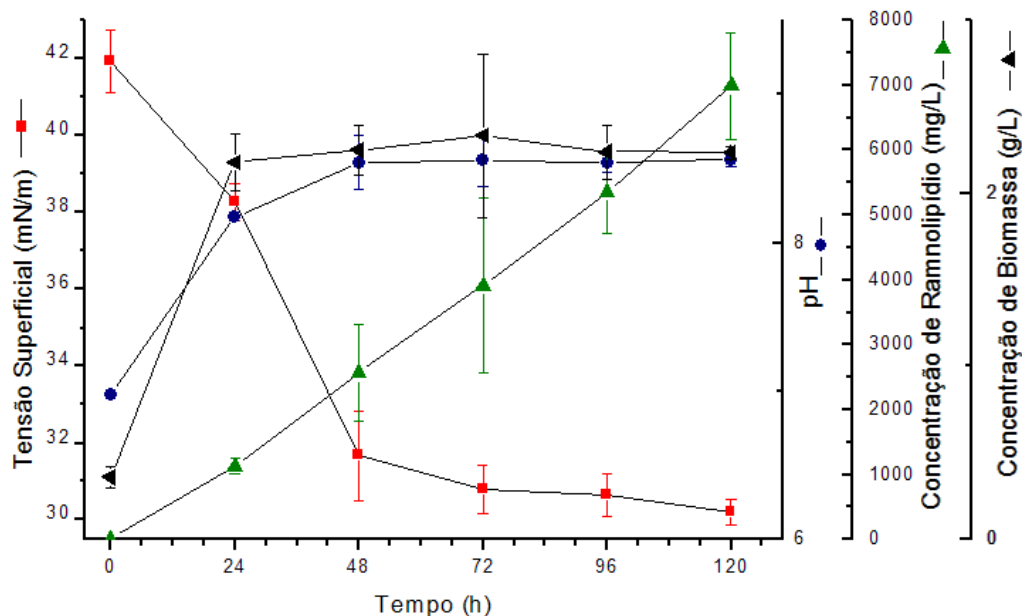


Figura 11: Cinética da produção de ramnolipídios pelas bactérias *P. aeruginosa* LBI e LMI 7a, crescendo em óleo usado na concentração 2% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

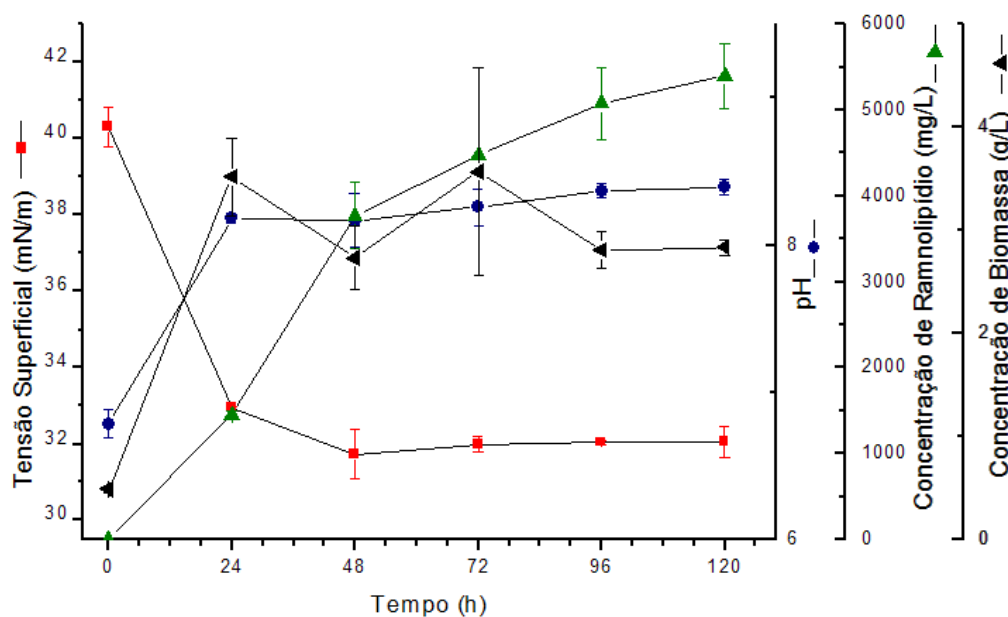


Figura 12: Cinética da produção de ramnolipídios pelas bactérias *P. aeruginosa* LMI 6c e LMI 7a, crescendo em óleo usado na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

Nos ensaios utilizando como fonte de carbono óleo de fritura usado, os cultivos em consórcio apresentaram valores inferiores aos esperados. As linhagens LBI e LMI 7a produziram 11.227,0mg/L e 9.207,0mg/L de ramnolipídios, quando crescendo isoladas em óleo de fritura usado à 2% (p/v) (BATISTA, 2007); porém, quando cultivadas em consorcio, sua produção diminuiu para 6.988,64 mg/L de ramnolipídios (Figura 11).

Quando cultivadas em óleo de fritura usado a uma concentração de 4% (p/v), as linhagens LBI 7a (Figura 2) e LBI 6c (Figura 3) produziram no final da fermentação, uma concentração de 8.349,16 mg/L e 5.561,16 mg/L de ramnolipídios respectivamente; sendo que o cultivo em consorcio, novamente alcançou um valor menor, de 5.399.45 mg/L de ramnolipídios (Figura 12).

6.5. Ensaios fermentativos do consórcio das linhagens de *P. aeruginosa* que melhor produziram ramnolipídios em glicerol nas concentrações de 2 e 4% (p/v)

Dos ensaios fermentativos com glicerol o que apresentou melhor resultado foi o cultivo das *P. aeruginosa* LMI 6c e LMI 7a com uma concentração da fonte de carbono de 4% (p/v) (Figura 13), cuja concentração de ramnolipídios, ao final da fermentação, foi de 6.701,0 mg/L. Já o ensaio com as linhagens LBI e LMI 7a na concentração de 2% (p/v) (Figura 14) alcançou uma produção de ramnolipídios de 3.015,6 mg/L. Em ambos os cultivos pode ser visualizada a ação do biossurfactante, um vez que, a tensão superficial dos meios de cultivos diminuíram, ao decorrer de 72 horas, para 36,0 mN/m e 33,1 mN/m, para os cultivos em 2 e 4% (p/v) (Figura 14 e 13) da fonte de carbono, respectivamente.

O aumento biomassa pode ser visualizado diretamente pela mudança no aspecto do meio de cultivo. O aumento do pH do cultivo, também pode ser considerado como um indício indireto da produção de biomassa, onde o cultivo em 2% (p/v) (Figura 14) de glicerol atingiu, ao final da fermentação, um pH de 9,06, e o cultivo em 4% (p/v) (Figura 13) atingiu 8,52, e as respectivas concentrações de biomassa 2,51 e 3,33g/L.

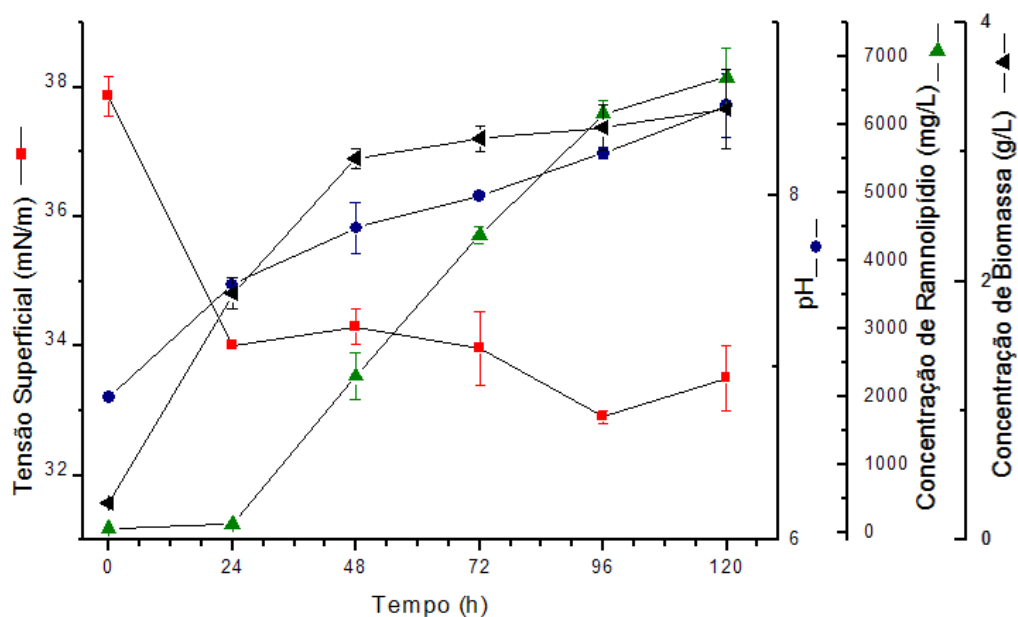


Figura 13: Cinética da produção de ramnolipídios pelas bactérias *P. aeruginosa* LMI 6c e LMI 7a, crescendo em glicerol na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

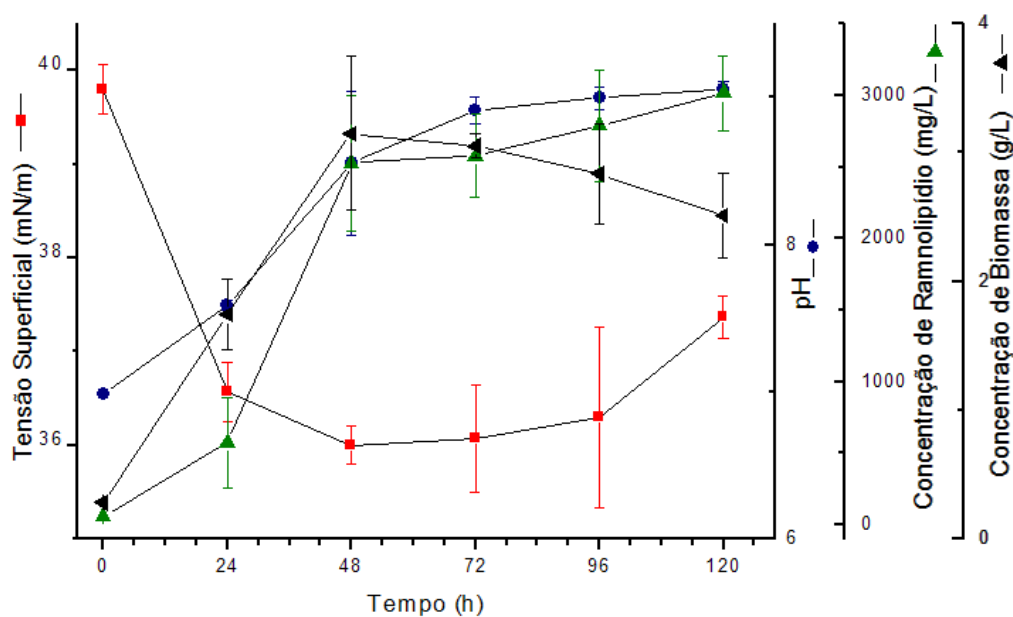


Figura 14: Cinética da produção de ramnolipídios pelas bactérias *P. aeruginosa* LBI e LMI 7a, crescendo em glicerol na concentração 2% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

Com relação ao cultivo em glicerol 2% (p/v), as linhagens LBI e LMI 7a produziram respectivamente 3.289,2 mg/L e 3.796,1 mg/L (BATISTA, 2007), e quando cultivadas em consórcio a concentração de ramnolipídios final foi de 3.015,6 mg/L (Figura 14), inferior ao cultivo separado. As cepas LMI 6c e LMI 7a quando cultivadas em glicerol na concentração de 4% (p/v) produziram concentrações de ramnolipídios de respectivamente 5.323.1 mg/L

(Figura 6) e 7.439.8 mg/L (Figura 5). Quando cultivadas em consórcio na mesma concentração de glicerol a concentração final de ramnolipídios foi de 6.701,0 mg/L (Figura 13).

6.6. Ensaios fermentativos do consórcio das linhagens de *P. aeruginosa* que melhor produziram ramnolipídios em *n*-parafina nas concentrações de 2 e 4% (p/v)

Ao final do tempo de fermentação as linhagens LMI 7a e LBI cultivadas em 2% (p/v) (Figura 15) e as *P. aeruginosa* LMI 6c e LMI 7a em 4% (p/v) (Figura 16), obtiveram os valores de produção de ramnolipídios de 80,324 e 92,756 mg/L, e uma diminuição da tensão superficial para respectivamente 36,3 e 38,0 mN/m. A alteração do pH final do cultivo foi bem semelhante em ambos os casos, sendo de 8,4 para a concentração de 2% (p/v) (Figura 15) e 8,47 para a concentração de 4% (p/v) (Figura 16), já a quantidade de biomassa em ambos os casos obteve o mesmo valor de 2,705g/L (Figuras 15 e 16).

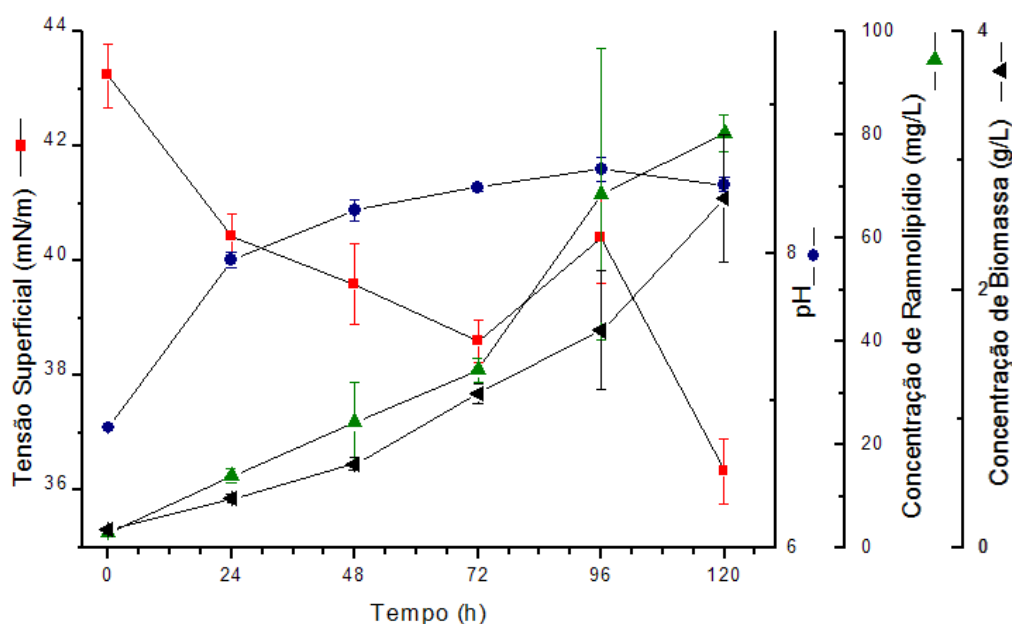


Figura 15: Cinética da produção de ramnolipídios pelas bactérias *P. aeruginosa* LMI 7a e LBI, crescendo em *n*-parafina na concentração 2% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

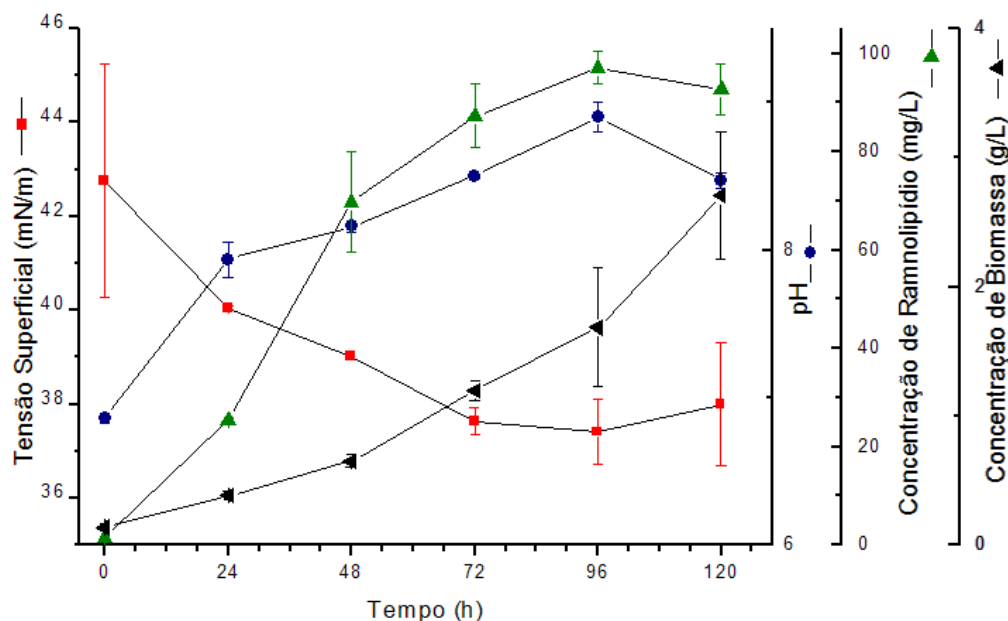


Figura 16: Cinética da produção de ramnolipídios pelas bactérias *P. aeruginosa* LMI 6c e LMI 7a, crescendo em *n*-parafina na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

Nos cultivos com 2% (p/v) de *n*-parafina, as linhagens LMI 7a e LMI 6c produziram 88,87 e 90,04 mg/L quando cultivadas separadamente (BATISTA, 2007), e o consórcio das cepas acarretou em uma produção inferior de 80,324 mg/L (Figura 15). As *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 9) e LMI 6c (Figura 8) cultivadas em 4% (p/v) de *n*-parafina, alcançaram as seguintes produções de ramnolipídios 94,053 e 97,619 mg/L, e seu consórcio obteve concentração final inferior de 92,756 mg/L (Figura 16).

6.7. Ensaios fermentativos com adição de 2% (p/v) de uma solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios às concentrações de 2 e 4% (p/v) de óleo de fritura usado

Com relação à adição de ramnolipídios no cultivo em óleo usado à 2% (p/v), linhagem LBI (Figura 17) produziu 7.983,78 mg/L de ramnolipídios, seguida pelas cepas LMI 6c (Figura 18) e LMI 7a (Figura 19) com respectivamente 5.283,23 e 4.258,81 mg/L. Os cultivos ao tempo final apresentaram redução da tensão superficial, onde a menor atingida foi da cepa LMI (Figura 17), com 30,9 mN/m, seguida por 31,1 e 31,8 mN/m, *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 19) e LMI 6c (Figura 18), respectivamente. Como indicativo indireto de crescimento celular ocorreu o aumento do pH final do cultivo para a linhagem LMI 7a (Figura 19) de 8,9, e para as linhagens LBI (Figura 17) e LMI 6c (Figura 18) de respectivamente 8,57

e 7,88. A concentração de biomassa obtida foram de 2,949; 4,151; 4,223 g/L, para as respectivas *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 18), LMI 7a (Figura 19) e LBI (Figura 17).

Nos cultivos com concentração de óleo à 4% (p/v) a melhor produção de ramnolipídios foi 8.112,42 mg/L da linhagem LMI 7a (Figura 20), seguida de 7.121,07 mg/L e 5.876,21 mg/L das respectivas cepas LMI 6c (Figura 21) e LBI (Figura 22). Devido a produção de biossurfactante os ensaios apresentaram redução da tensão superficial final, a cepa LMI 6c (Figura 21) diminuiu para 30,4 mN/m, e as respectivas linhagens LMI 7a (Figura 20) e LBI (Figura 22) para 30,9 mN/m e 31,2 mN/m. A concentração de biomassa atingiu os valores de 2,849; 4,033; 4,515 g/L, para as respectivas bactérias *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 21), LBI (Figura 22) e LMI 7a (Figura 20). Como consequência do crescimento celular houve o aumento do pH final do meio de 8,02 para a cepa LBI (Figura 22), e 8,44 e 8,76 para LMI 6c (Figura 21) e LMI 7a (Figura 20), respectivamente.

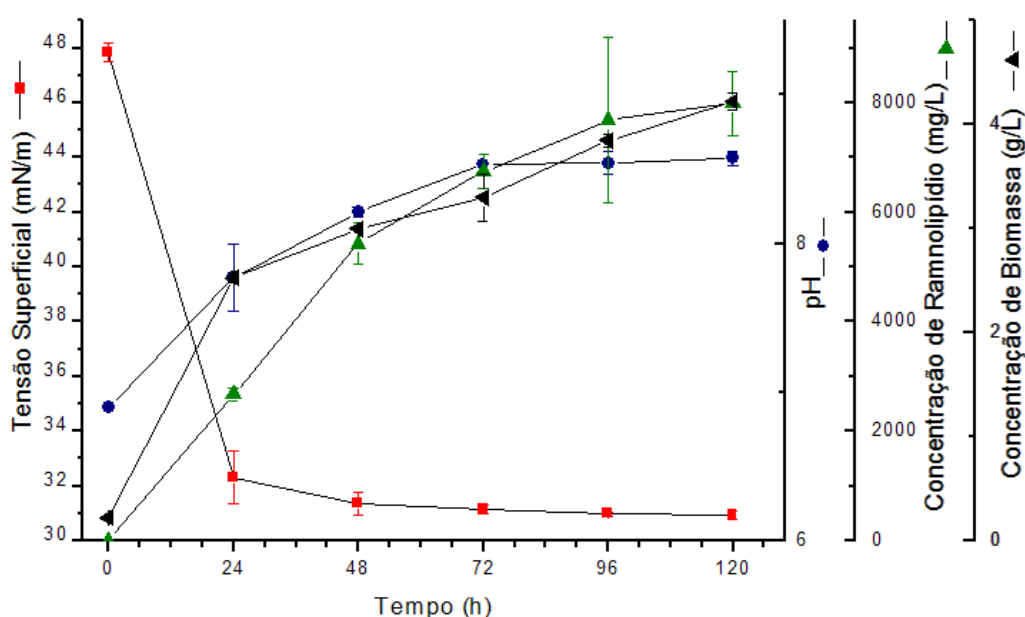


Figura 17: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em óleo usado na concentração 2% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

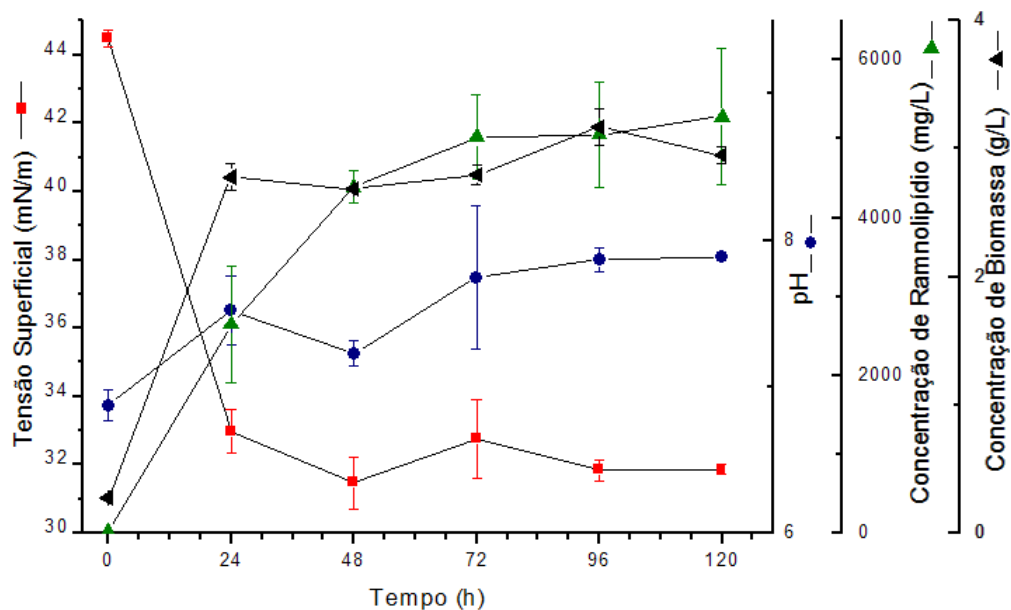


Figura 18: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em óleo usado na concentração 2% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

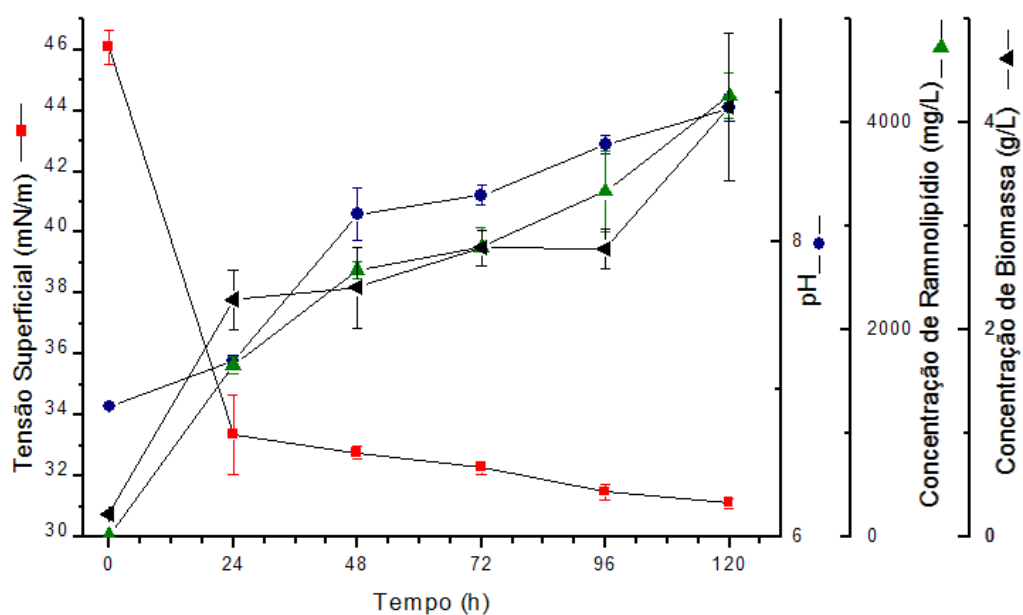


Figura 19: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em óleo usado na concentração 2% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

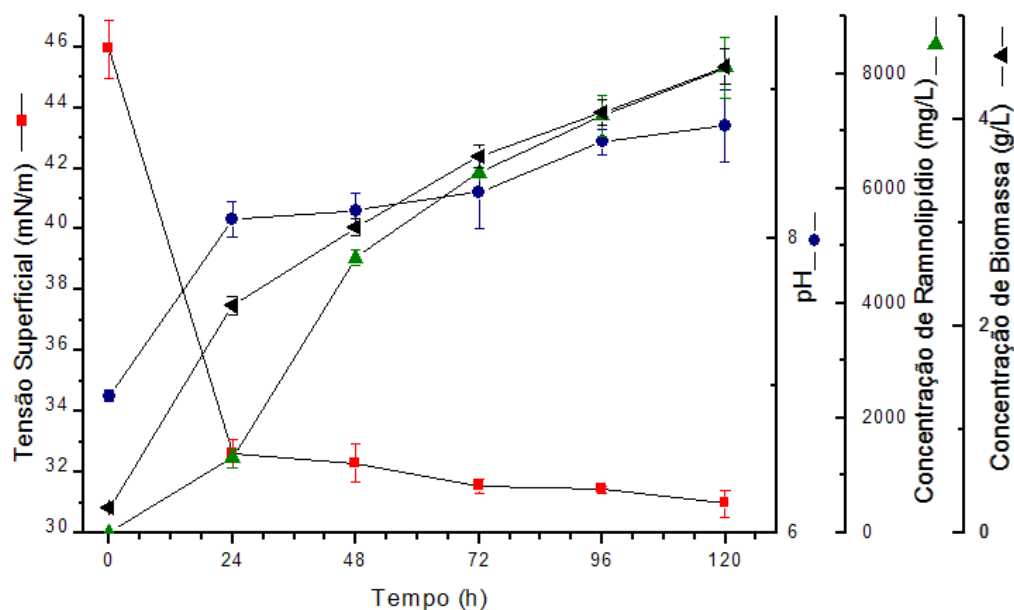


Figura 20: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em óleo usado na concentração 4% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

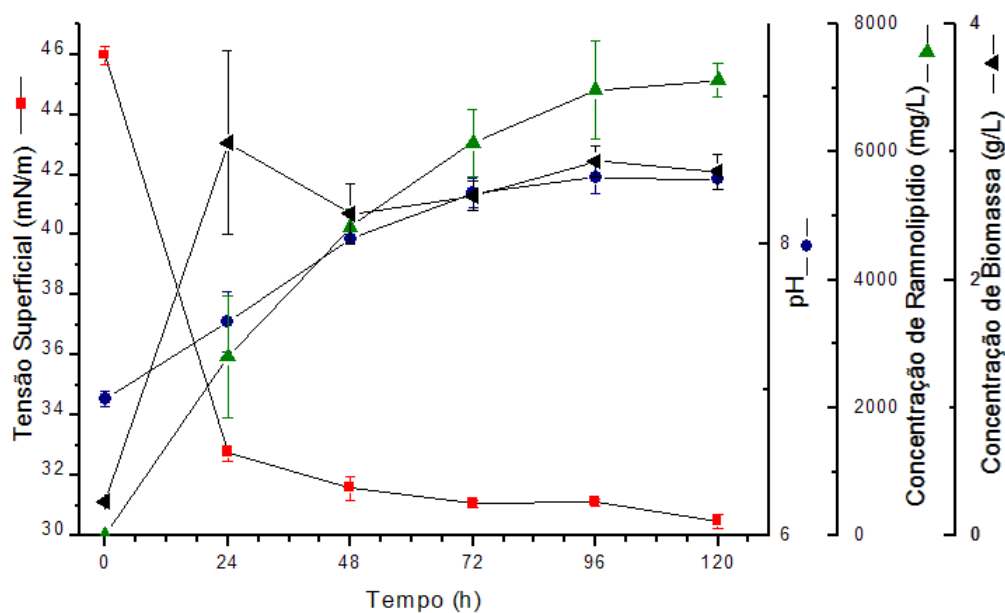


Figura 21: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em óleo usado na concentração 4% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

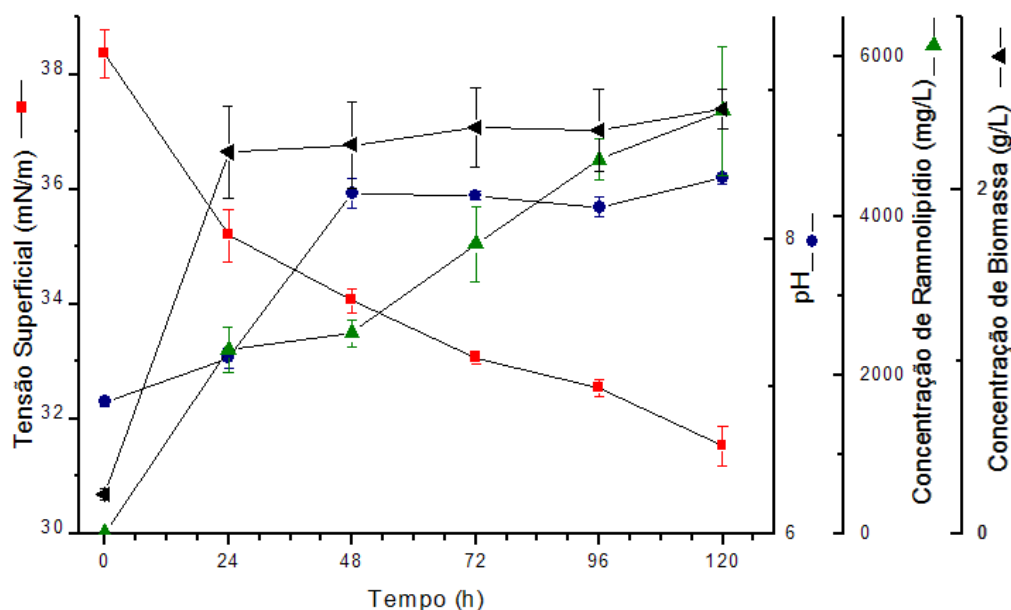


Figura 22: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em óleo usado na concentração 4% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

Raza et al. (2006) avaliaram óleo de canola, milho e soja, todos usados em fritura de alimentos, em uma concentração de 2% (w/v), como fontes de carbono na produção de ramnolipídios pela linhagem mutante *P. aeruginosa* EBN-8 na presença ou ausência de um ramnolipídio precursor. O óleo de soja foi o substrato melhor utilizado, produzindo 9.300,0 mg/L de ramnolipídio, com a adição de ramnolipídio precursor.

A bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c quando cultivada em óleo e suplementado com ramnolipídios apresentou produções superiores em ambas as concentrações, quando comparada as produções sem adição da ramnolipídios iniciais, de 4.506,20 mg/L de ramnolipídios em óleo de fritura 2% (p/v) (BATISTA, 2007) e 5.561,91 em 4% (p/v) (Figura 3).

No cultivo da cepa LBI apenas na concentração de 4% (p/v) (Figura 22) houve o efeito do ramnolipídio inicial, em relação à condição sem o suplemento do mesmo, pois a produção aumentou de 4.001,23 mg/L de ramnolipídio (Figura 4), para 5.876,21 mg/L de ramnolipídio.

A linhagem LMI 7a em todos os cultivos com óleo, a adição de ramnolipídio inicial inibiu a produção biossurfactante, pois em estudos anteriores foi obtido uma concentração final de 9.207,00 mg/L de ramnolipídio em óleo de fritura 2% (p/v) (BATSITA, 2007) e 8.349,16 mg/L em 4% (p/v) (Figura 2).

6.8. Ensaaios fermentativos com adição de 2% (p/v) de uma solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios às concentrações de 2 e 4% (p/v) de glicerol

As produções de ramnolipídios nos cultivos em 2% (p/v) de glicerol alcançaram valores próximos entre si para as três diferentes linhagens, sendo 4.413,48 mg/L para a *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 23), 4.398,72mg/L e 4.366,58mg/L, para as respectivas linhagens LBI (Figura 24) e LMI 6c (Figura 25). Também foi possível visualizar a diminuição da tensão superficial ao final do tempo de fermentação, sendo de 32,1 mN/m para a linhagem LMI 7a (Figura 23), 31,6 mN/m para a linhagem LBI (Figura 24) e 31,1 mN/m para LMI 6c (Figura 25). As alterações na cor e textura dos cultivos indicam a ocorrência de crescimento celular, e foram determinadas as concentrações finais de biomassa de 3,44; 3,11 e 2,65 g/L para a cepa LMI 6c (Figura 25), LMI 7a (Figura 23) e LBI (Figura 24), respectivamente. Por causa do crescimento celular também ocorreu a alteração do pH final do cultivo de 8,6 para *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 23); 8,23 e 8,20 para as respectivas cepas LMI 6c (Figura 25) e LBI (Figura 24).

A linhagem LMI 7a (Figura 26) foi a apresentou maior produção na concentração da fonte de carbono de 4% (p/v), seguida das cepas LBI (Figura 27) e LMI 6c (Figura 28), com os respectivos valores de concentrações finais de ramnolipídios 7.411,23, 5.324,86, 4.431,04 mg/L. Nos três diferentes cultivos ocorreram a diminuição da tensão superficial, onde a cepa LMI 6c (Figura 28) alcançou 30,9 mN/m, seguido da LBI (Figura 27) com 31,5 mN/m e LMI 7a (Figura 26) com 31,8 mN/m. Os valores finais de pH ficaram todos acima de 8,0, o que indica um bom crescimento celular, 8,7 para a linhagem LMI 7a (Figura 26), 8,41 e 8,23 para as respectivas cepas LBI (Figura 27) e LMI 6c (Figura 28). A *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 28) teve a maior produção de biomassa, 3,451g/L, seguida pelas cepas LMI 7a (Figura 26) e LBI (Figura 27), com as respectivas produções de 3,079 e 2,466 g/L.

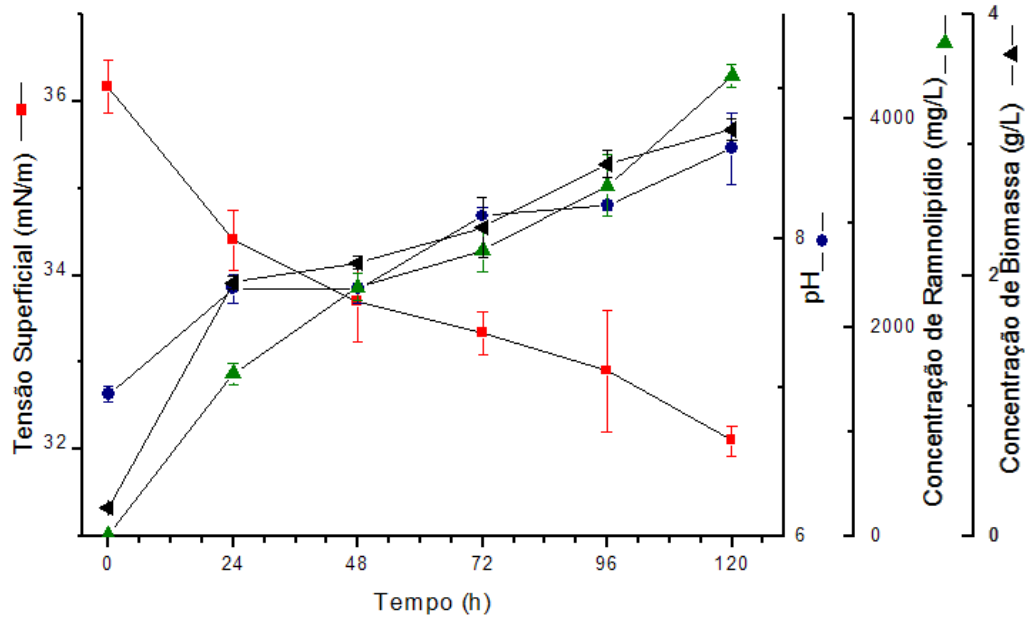


Figura 23: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em glicerol na concentração 2% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

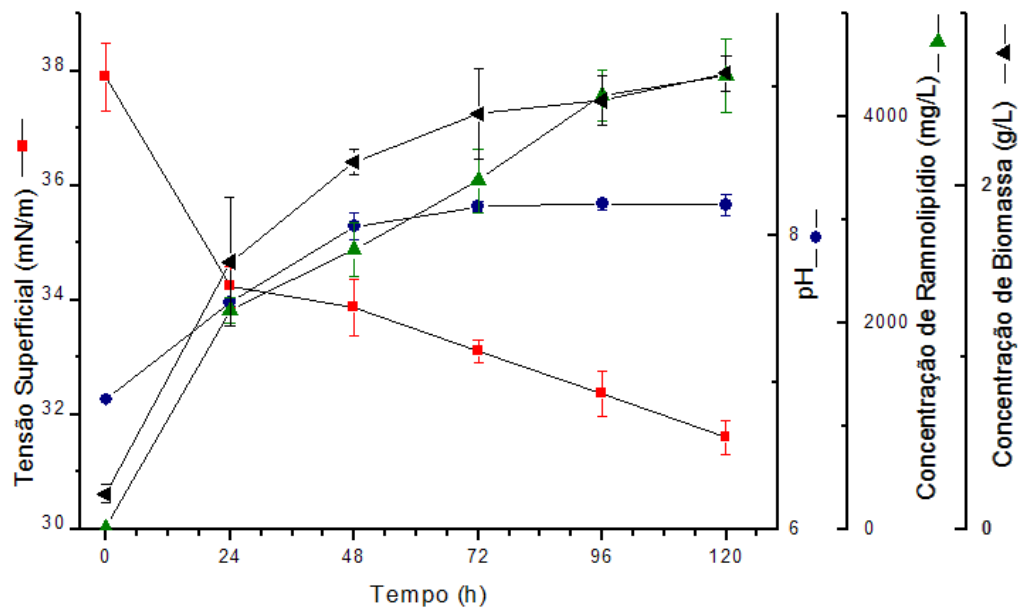


Figura 24: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em glicerol na concentração 2% (p/v), com adição ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

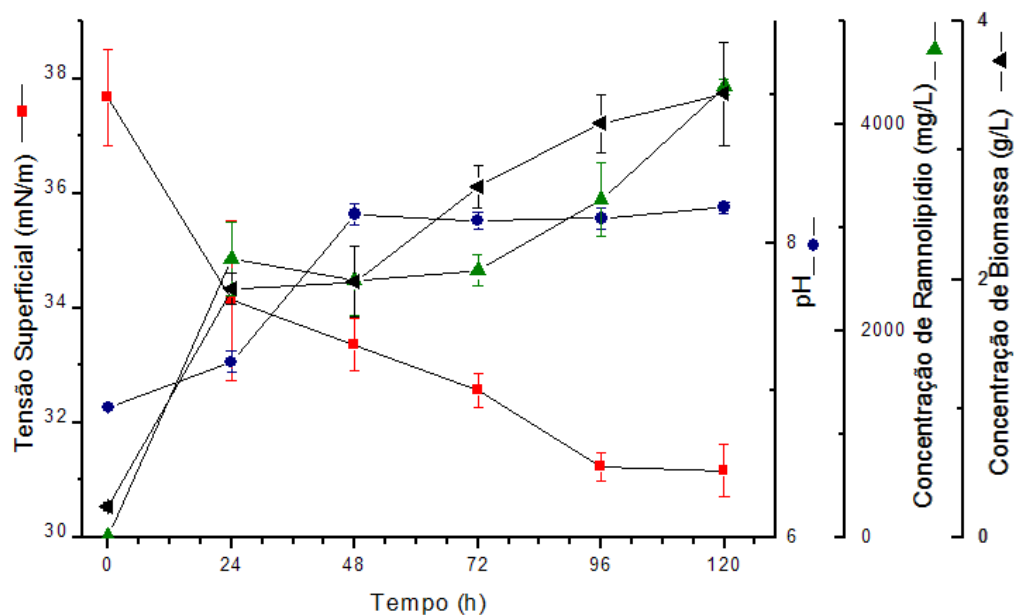


Figura 25: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em glicerol na concentração 2% (p/v), com adição rhamnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

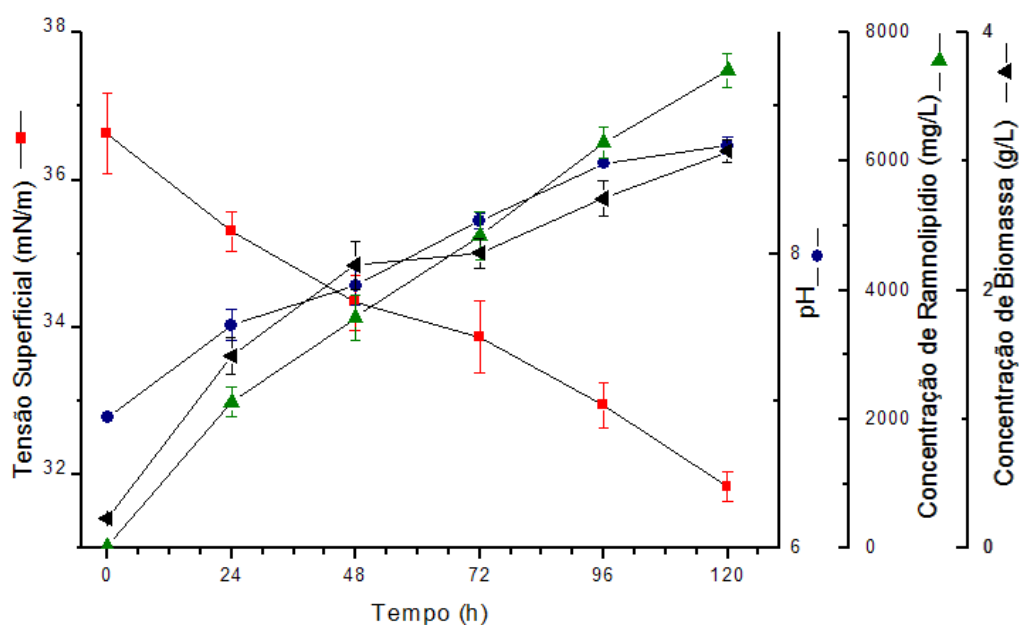


Figura 26: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em glicerol na concentração 4% (p/v), com adição de rhamnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

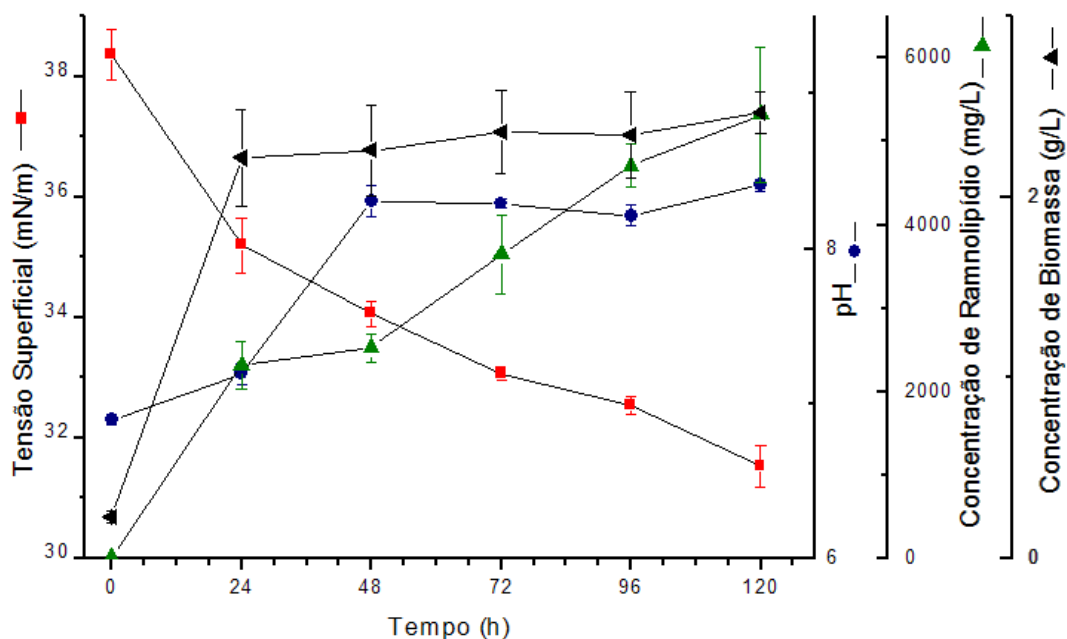


Figura 27: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em glicerol na concentração 4% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

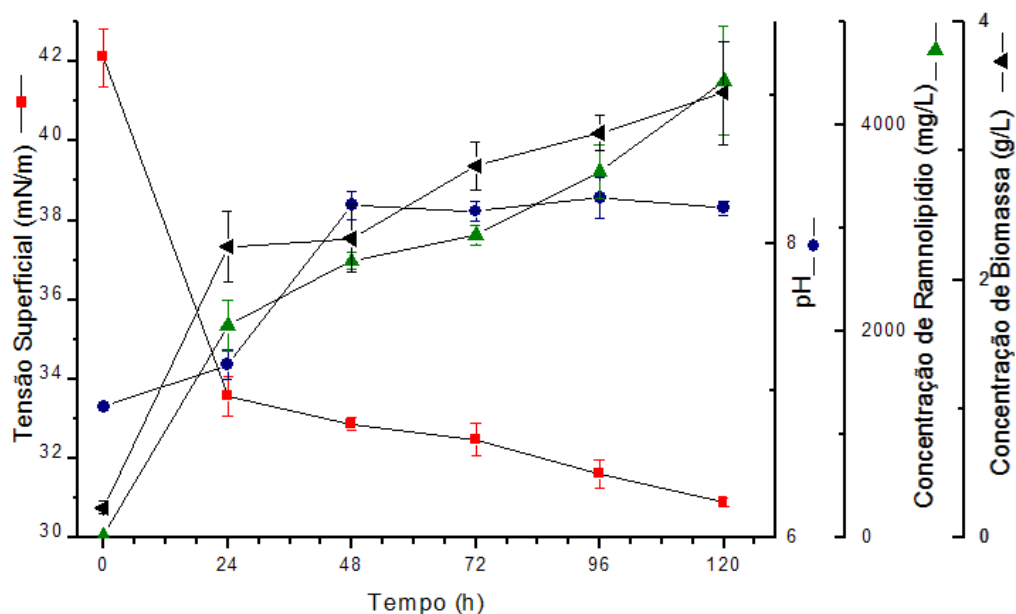


Figura 28: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em glicerol na concentração 4% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

A adição de ramnolipídio inicial auxiliou a linhagem LBI em ambos os cultivos com glicerol, quando comparamos as produções anteriores em glicerol 2% (p/v), de 3.289,20mg/L de ramnolipídios (BASTISTA, 2007) e 4.995,33 mg/L em 4% de glicerol (p/v) (Figura 7). No cultivo da linhagem LMI 7a em glicerol à concentração 2% (p/v) houve um aumento na produção com relação a sem suplemento, onde a produção foi de 3.796,11 mg/L (BATISTA,

2007) e na concentração de 4% (p/v) o valor de produção foi muito semelhante ao cultivo em 4% (p/v) sem o suplemento de ramnolipídio (7.439,89 mg/L, Figura 5). Nos cultivos da linhagem LMI 6c em glicerol, houve aumento da produção apenas na concentração de 2% (p/v) de glicerol, em relação ao ensaio sem o suplemento de ramnolipídio, o qual alcançou a produção final de 3.096,30 mg/L em 2% (p/v) de glicerol (BATISTA, 2007).

6.9. Ensaios fermentativos com adição de 2% (p/v) de uma solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios às concentrações de 2 e 4% (p/v) de *n*-parafina

Os ensaios contendo *n*-parafina à 2% (p/v) obtiveram os seguintes valores finais de produção de ramnolipídios 92,756 mg/L, 91,894 mg/L e 94,053 mg/L, para as respectivas linhagens LBI (Figura 29), LMI 7a (Figura 30) e LMI 6c (Figura 31); com o aumento da concentração de *n*-parafina para 4% (p/v) e adição de ramnolipídio inicial, as linhagens *P. aeruginosa* LBI (Figura 32), *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 33) e 6c (Figura 34) aumentou seus valores da produção de ramnolipídios para 123,996 mg/L, 100,000 mg/L e 138,918 mg/L, respectivamente.

A diminuição da tensão superficial pode ser observada em todos os ensaios exceto na linhagem LBI com a concentração de 2% (p/v) de *n*-parafina (Figura 29), onde a medição inicial foi de 33,3 mN/m, e 34,03 ao final. Na mesma concentração anterior, a menor tensão superficial obtida pela linhagem LMI 6c (Figura 31) foi de 35,6 no tempo 72 horas, ocorrendo um aumento desse valor ao final da fermentação (36,16 mN/m); sendo que a bactéria 7a (Figura 30) apresentou um valor de 35,06 mN/m, ao decorrer de 120 horas. Com relação aos ensaios contendo 4% (p/v) de *n*-parafina os valores finais de tensão superficial foram de 34,56 mN/m, 34,96 mN/m e 35,4 mN/m, para as respectivas linhagens *P. aeruginosa* LBI (Figura 32), *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 33) e *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 34).

Em se tratando de produção de biomassa, todos os ensaios obtiveram uma concentração final alta, quando comparada a produção de ramnolipídios, onde a bactéria LBI exibiu os valores finais de 5,431 g/L e 3,092 g/L, nas respectivas concentrações de *n*-parafina de 2% (p/v) (Figura 29) e 4% (p/v) (Figura 32). Os ensaios contendo 2% (p/v) da fonte de carbono tiveram os valores de biomassa de 5,397 g/L e 5,096 g/L, para as respectivas linhagens LMI 7a (Figura 30) e LMI 6c (Figura 31); já os ensaios contendo 4% (p/v) de *n*-parafina demonstraram os valores de 4,992 g/L para *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 33) e 5,308 g/L para *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 34).

As medidas finais do pH nos ensaios contendo 2% (p/v) de *n*-parafina, foram de 8,48, 8,84 e 8,58 para as respectivas linhagens LBI (Figura 29), LMI 7a (Figura 30) e LMI 6c (Figura 31). Sendo que os valores finais de pH nos ensaios com 4% (p/v) da fonte de carbono para as linhagens *P. aeruginosa* LBI (Figura 32), *P. aeruginosa* LMI 7a (Figura 33) e *P. aeruginosa* LMI 6c (Figura 34) estão por volta de 8,7.

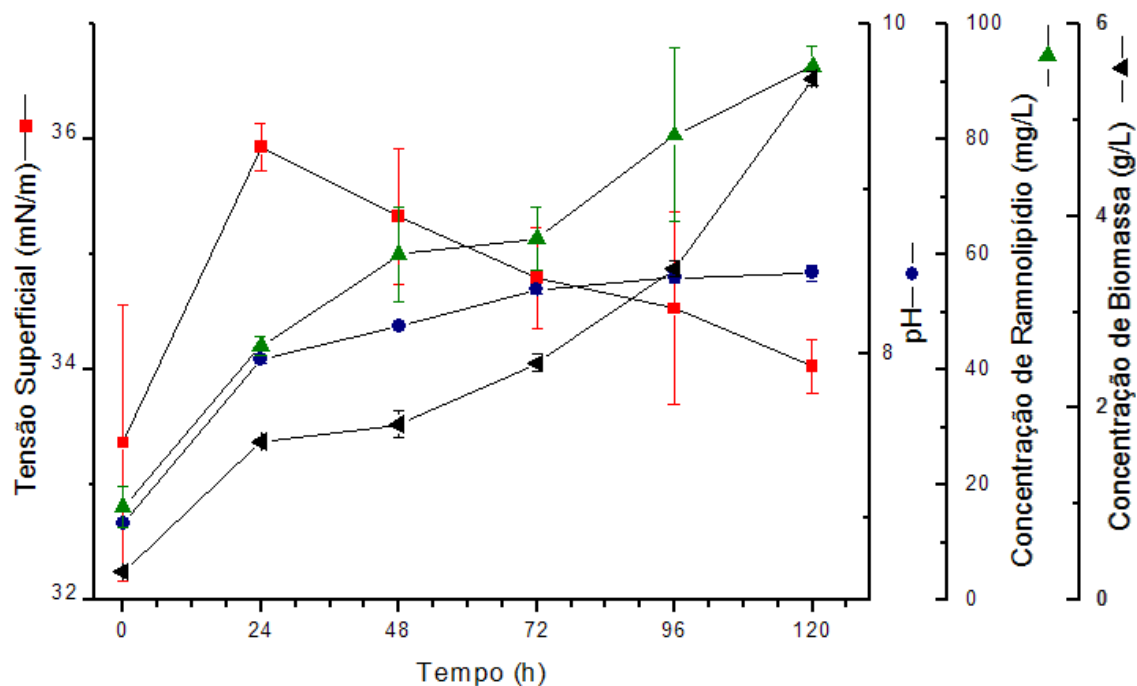


Figura 29: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em *n*-parafina na concentração 2% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

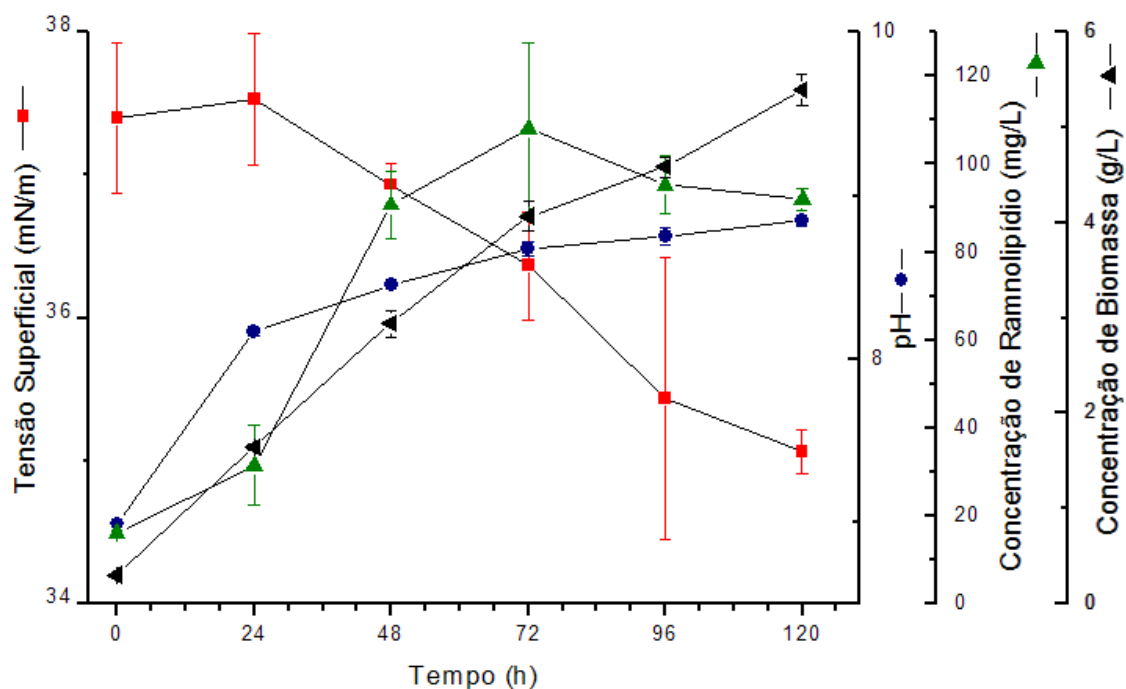


Figura 30: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em *n*-parafina na concentração 2% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

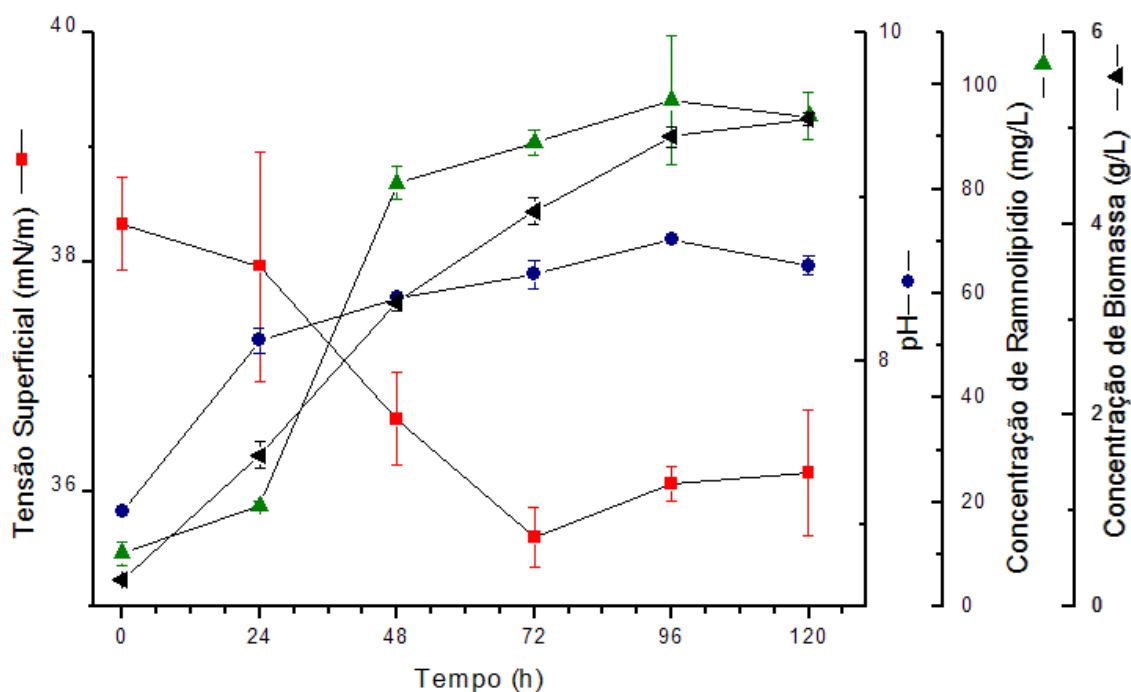


Figura 31: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em *n*-parafina na concentração 2% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

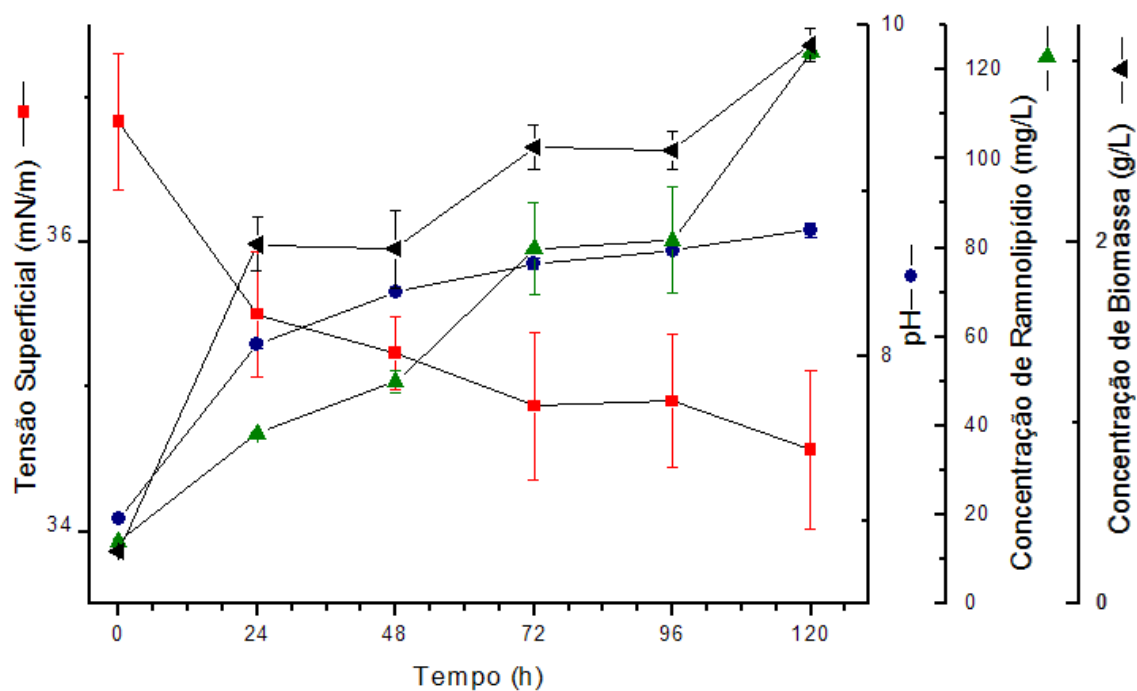


Figura 32: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em *n*-parafina na concentração 4% (p/v), com adição de rhamnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

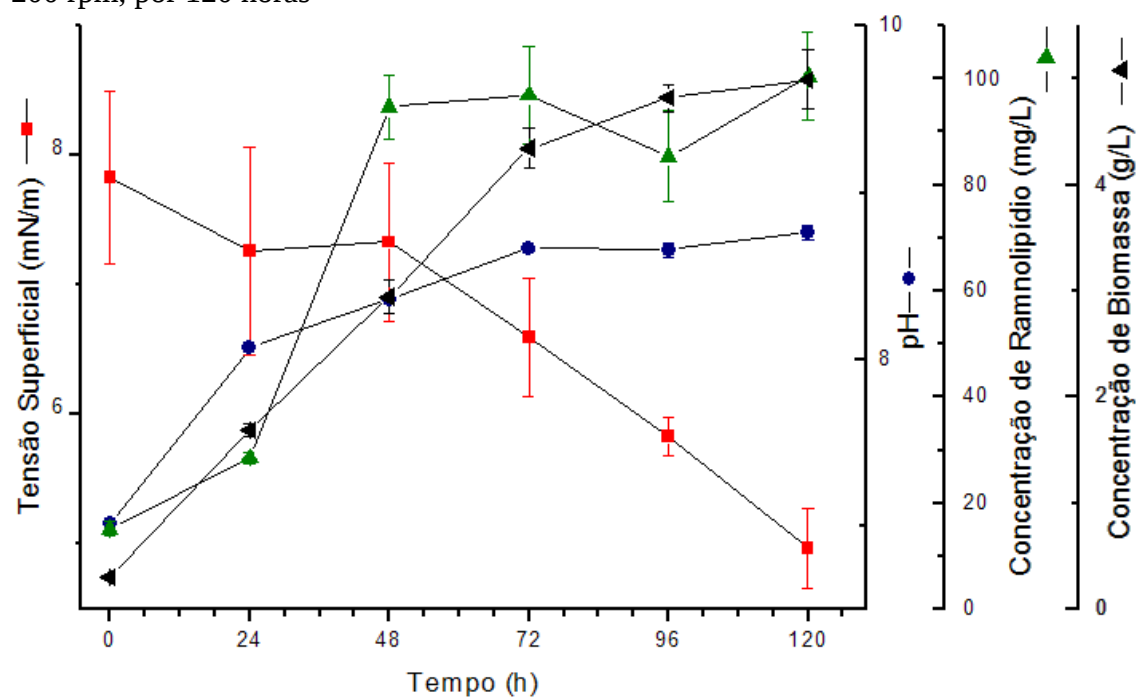


Figura 33: Cinética da produção de rhamnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em *n*-parafina na concentração 4% (p/v), com adição de rhamnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

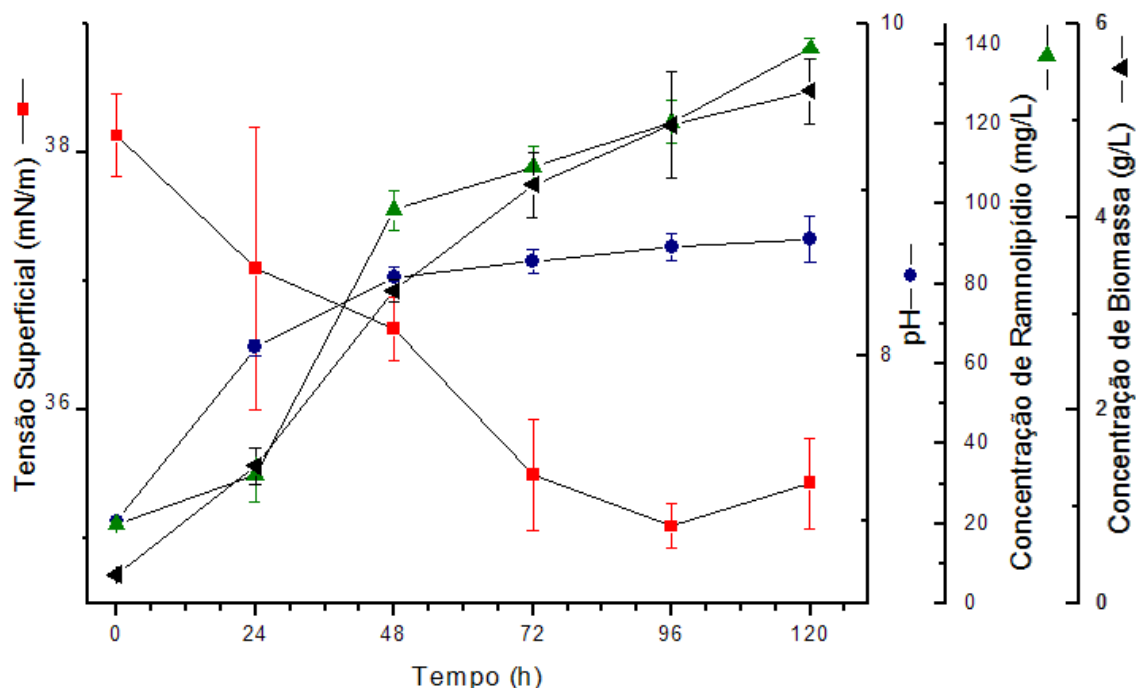


Figura 34: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em *n*-parafina na concentração 4% (p/v), com adição de ramnolipídios, a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas

Segundo Itoh et al (1971) a linhagem *P. aeruginosa* KY 4025 apresentou produção de ramnolipídios de 3.100,0 mg/L, utilizando *n*-parafina sem nenhum suplemento. *P. aeruginosa* PU-1 apresentou produção de 250,0 mg/L, mas, quando incubada com ramnolipídios, passou a apresentar produção semelhante à linhagem KY 4025.

No presente estudo, foi testada a adição de 2% de uma solução de 0,1% de ramnolipídios antes do início das fermentações, apesar de ter ocorrido um aumento na produção, os valores de produção de biossurfactantes não foram tão expressivos como os de Itoh (1971). Sendo que a *P. aeruginosa* LMI 7a produziu 88,87 mg/L de ramnolipídios quando cultivada em *n*-parafina à 2% sem adição de suplemento de ramnolipídios, *P. aeruginosa* LMI 6c produziu 90,04 mg/L e *P. aeruginosa* LBI produziu 68,49 mg/L (BATISTA, 2007), valores inferiores ao dos cultivo em 2% (p/v) de *n*-parafina, com ramnolipídio inicial, 92,756 mg/L, 91,894 mg/L e 94,053 mg/L, para as respectivas linhagens LBI (Figura 29), LMI 7a (Figura 30) e LMI 6c (Figura 31); o baixo aumento também ocorreu com os cultivos em 4% (p/v) de *n*-parafina.

6.10. Ensaios fermentativos com uma mistura de óleo de fritura usado e glicerol (1:1) às concentrações de 2 e 4% (p/v)

Em se tratando de produção de biossurfactante, todos os ensaios obtiveram seus maiores valores ao final da fermentação (120 horas); sendo de 4.995,33 mg/L a produção final da bactéria LBI na presença de 2% (p/v) da mistura (Figura 35) e 4.222,71 mg/L na presença de 4% (p/v) da mistura (Figura 36). A linhagem LMI 7a exposta a uma concentração de 2% (p/v) de fonte de carbono (Figura 37), apresentou 4.349,18 mg/L de ramnolipídio, e 4.553,50 mg/L quando adicionada mistura a 4% (p/v) (Figura 38). A produção de ramnolipídio da *P. aeruginosa* LMI 6c, foram de 5.338,37 mg/L e 4.874,59 mg/L, para as respectivas concentrações de 2 (Figura 39) e 4% (p/v) (Figura 40) da mistura.

Considerando a queda da tensão superficial, todos os ensaios tiveram uma diminuição relativamente alta, podendo destacar a *P. aeruginosa* LBI onde se observa uma queda para 30,66 mN/m, ao decorrer de 72 horas, com um aumento ao final da fermentação (32,06 mN/m), no meio contendo 2% (p/v) de fonte de carbono (Figura 35); quando comparado ao valor de 30,16 mN/m ao final da fermentação com 4% (p/v) da mistura (Figura 36). A bactéria LMI 7a apresentou uma tensão superficial por volta de 32 mN/m após 24 horas de cultivo, até ocorrer um aumento deste valor para 33,8 mN/m, ao final da fermentação na presença de 2% (p/v) da fonte de carbono (Figura 37); sendo que nos ensaios com 4% (p/v) da mistura (Figura 38) esse valor entorno de 32 mN/m, permaneceu até o término fermentativo. A tensão superficial observada nos ensaios com *P. aeruginosa* LMI 6c, foi de 31,5 mN/m ao tempo de 48 horas, aumentando para 32,0 mN/m, ao final do ensaio fermentativo contendo 2% (p/v) de fonte de carbono (Figura 39); sendo 30,4 mN/m o valor encontrado no término os ensaios com 4% (p/v) da mistura (Figura 40).

A linhagem *P. aeruginosa* LBI obteve seu maior aumento de biomassa (4,96 g/L), ao decorrer de 120 horas, no meio contendo 2% (p/v) de óleo e glicerol (Figura 35); quando comparado ao meio contendo 4% (p/v) da mistura (Figura 36) a mesma linhagem obteve 4,53 g/L no tempo de 48 horas e 4,09 g/L em 120 horas.

A máxima produção de biomassa da bactéria LMI 7a foi de 3,88 g/L no tempo 96 horas, seguida de um decréscimo ao final para 3,54 g/L, nos ensaios com 2% (p/v) da mistura (Figura 37); essa máxima produção de biomassa nos ensaios com 4% (p/v) da fonte de carbono (Figura 38) foi de 4,49 g/L ao decorrer de 24 horas, com uma diminuição para 3,22 g/L ao término. A *P. aeruginosa* LMI 6c apresentou no tempo 72 horas a sua máxima produção (5,54 g/L), os ensaios com 2% (p/v) da mistura de óleo e glicerol (Figura 39),

atingindo uma concentração final de 5,06 g/L. A concentração final dos ensaios com a mesma linhagem, porém com 4% (p/v) da fonte de carbono (Figura 40) foi de 4,31 g/L.

Com relação às medições de pH nos ensaios com 2% (p/v) da mistura, temos as linhagens LBI (Figura 35) e LMI 7a (Figura 37) com valores finais próximos à 8,7; sendo que para a bactéria LMI 6c (Figura 39), seu valor final foi de 8,31. Já os ensaios contendo 4% (p/v) de fonte de carbono, temos o valor de pH máximo atingindo após 24 horas (por volta de 8,4, em todos os ensaios), ocorrendo um decréscimo ao final para 7, 2.

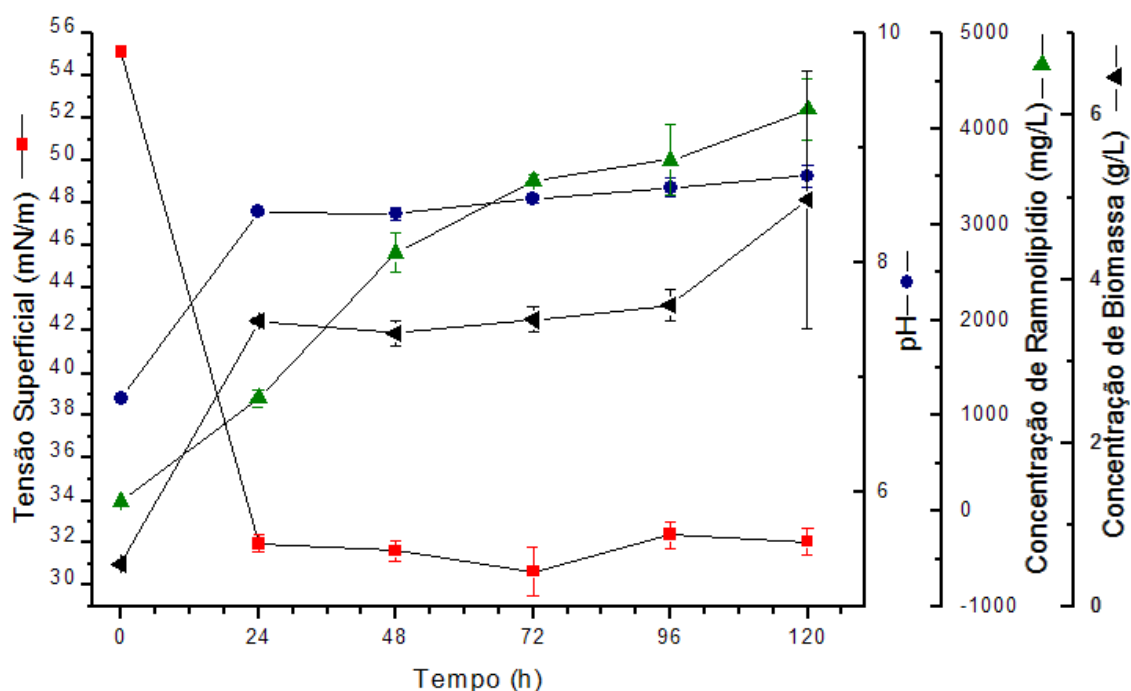


Figura 35: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em uma mistura de óleo e glicerol (1:1) na concentração 2% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

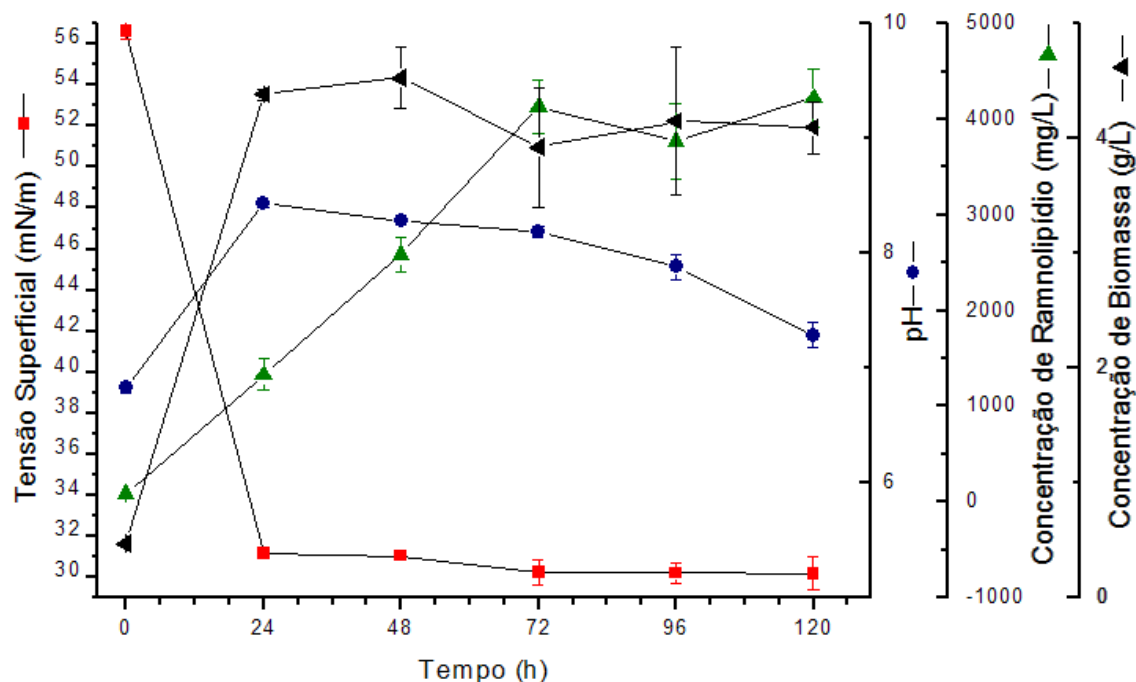


Figura 36: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LBI, crescendo em uma mistura de óleo e glicerol (1:1) na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

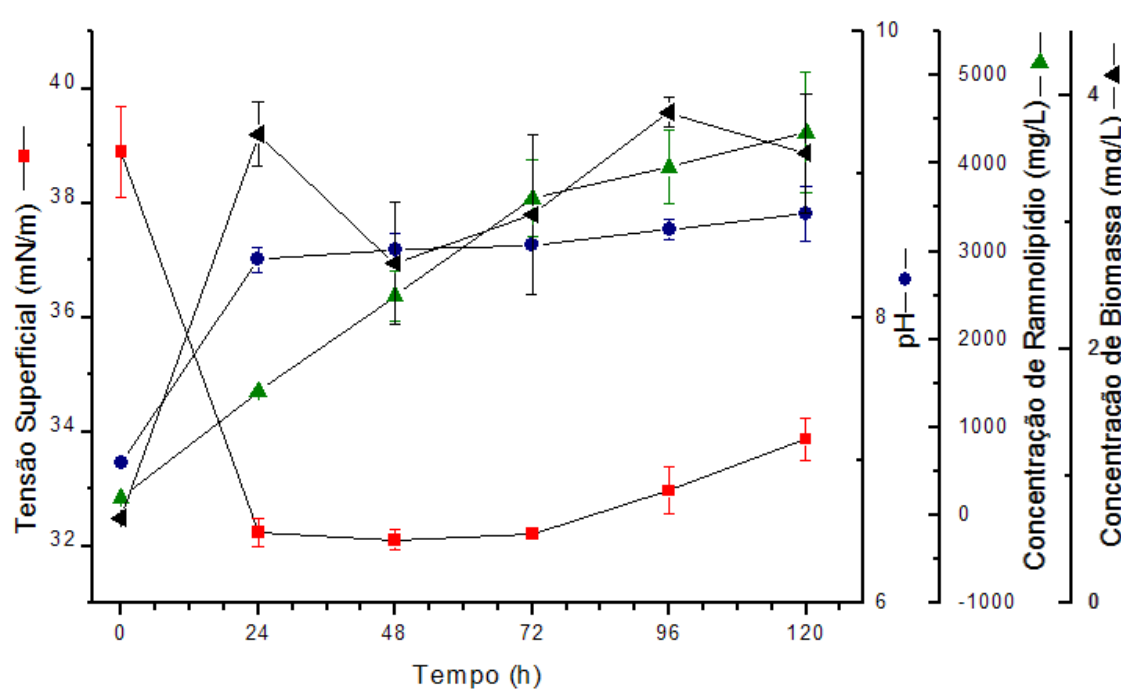


Figura 37: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em uma mistura de óleo e glicerol (1:1) na concentração 2% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

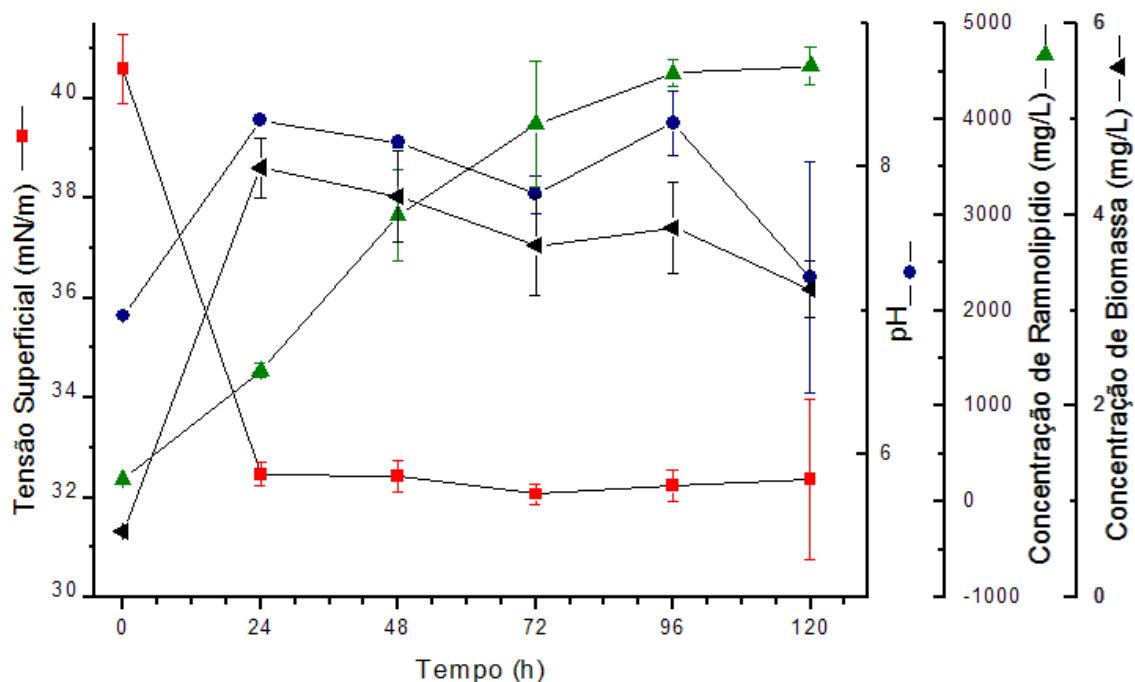


Figura 38: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 7a, crescendo em uma mistura de óleo e glicerol (1:1) na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

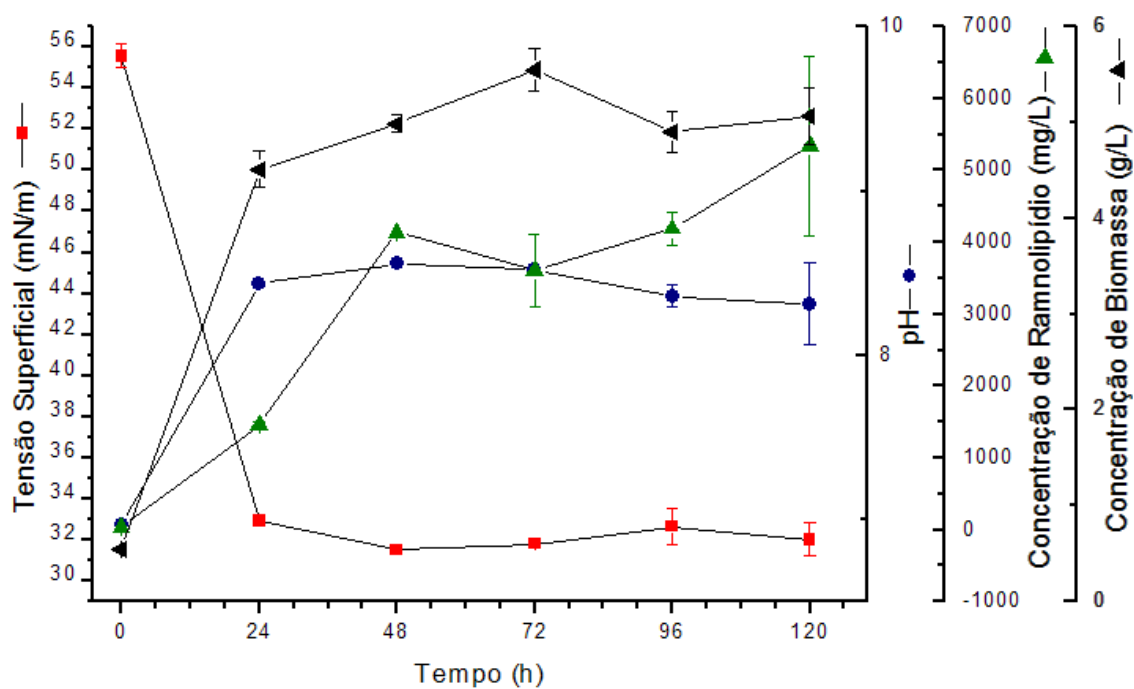


Figura 39: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em uma mistura de óleo e glicerol (1:1) na concentração 2% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

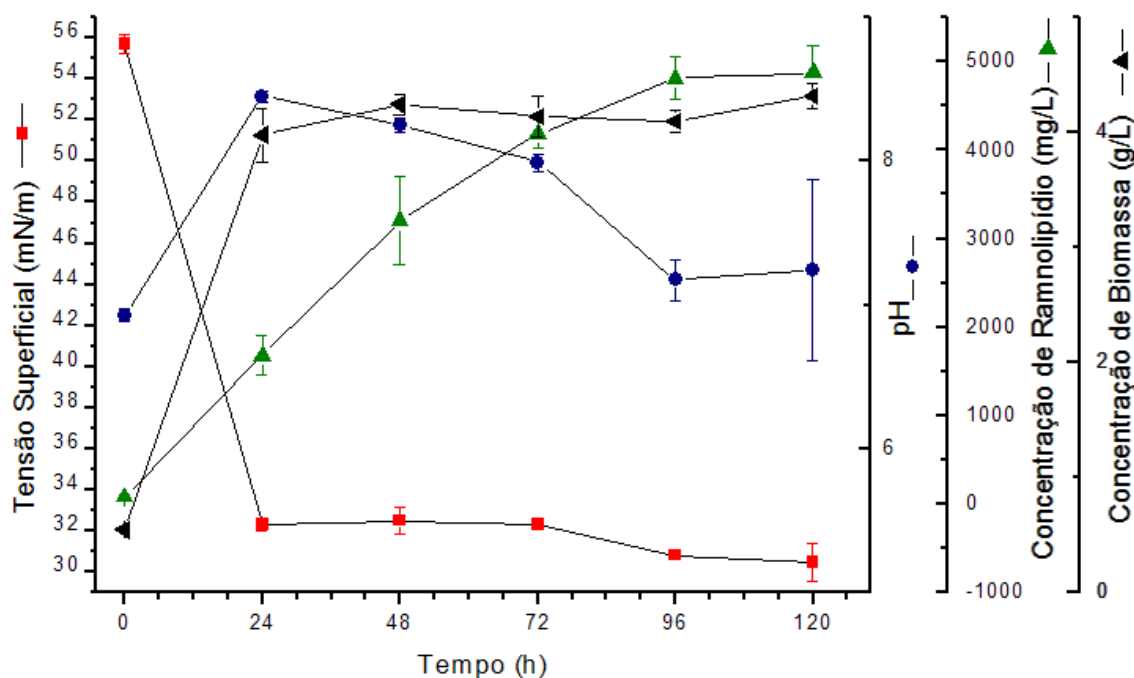


Figura 40: Cinética da produção de ramnolipídios pela bactéria *P. aeruginosa* LMI 6c, crescendo em uma mistura de óleo e glicerol (1:1) na concentração 4% (p/v), a 30°C e agitação de 200 rpm, por 120 horas.

Segundo Sylatk e Wagner (1987), a produção de biossurfactante pode ocorrer pela adição de precursores como compostos lipofílicos e diferentes fontes de carbono, assim foram testados o uso da mistura de óleo de fritura usado e glicerol (1:1). Porém no cultivo das cepas LBI (Figura 35) e LMI 7a (Figura 37) na mistura das fontes de carbono à 2% (p/v), a produção de ramnolipídios foi inferior ao cultivo das mesmas em somente óleo a 2% (p/v). O mesmo ocorreu com o cultivo em mistura de fontes de carbono à 4% (p/v) para as linhagens LMI 7a (Figura 38) e LMI 6c (Figura 40), onde o cultivo em óleo de fritura usado à 4% (p/v) alcança produções de ramnolipídios superiores. A utilização da mistura como fonte de carbono só foi eficaz no cultivo da linhagem LMI 6c na concentração de 2% (Figura 39), pois sua produção (5.338,37 mg/L) superou os valores de produção das duas fontes separadas na mesma concentração, 4.506,20 e 3.096,30 mg/L com óleo e glicerol, respectivamente.

6.11. Aderência bacteriana através do método de BATH (Bacterial Adherence To Hydrocarbon).

Com a utilização do método de BATH foi possível determinar a aderência bacteriana das linhagens estudadas. A *P. aeruginosa* LMI 6c foi a linhagem que apresentou menor valor

de aderência, 52%, seguida da linhagem LMI 7a com 78,5 %, e a cepa LBI possui a maior aderência de 87,6 %. Segundo Zhang e Miller (1994), a aderência bacteriana pode ser usada como uma estimativa da afinidade dos microrganismos à substratos hidrofóbicos, assim possibilita uma seleção prévia de microrganismo conforme a fonte de carbono a ser utilizada.

7. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos pelos cultivos, pode-se considerar as linhagens estudadas como um potencial para a produção de ramnolipídios, onde as mesmas estão aptas a crescerem e produzirem biossurfactante em condições variadas. A utilização de óleo de fritura usado como fonte de carbono, mostrou-se como uma excelente alternativa para o cultivo de *P. aeruginosa*, seguido do glicerol e por último *n*-parafina, onde é necessário maiores estudos para melhoria da produção.

8. REFERÊNCIAS

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, Washington, v.17, n.5, p.1367-1371, 2001.

BATISTA, F. L. **Avaliação de fontes alternativas de carbono na produção de biossurfactantes (ramnolipídios)**. 2007. 39 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2007.

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

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

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

CHANDRASENKARAN, E.V.; BEMILLER, J.N. Constituent analyses of glycosaminoglycans. In: WHISTLER, R. L.; LAURENCE, M. (Org.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**. Nova York: Academic Press, 1980. p.89-96.

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

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.

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

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

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

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

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin. **Japanese Journal of Antibiotics**, Tóquio, v.24, n.12, p.855-859, 1971.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBOUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.139, n.1, p.265-275, 1951.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.18, n.1, p.37-42, 1997.

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

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

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

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L.A.G.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, Nova York, v.21, n.5, p.1562-1566, 2005.

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

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

ROSEN, M.J. Surfactants and interfacial phenomena. **Jonh & Willey Sons**, New York, 431 p., 1989.

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

SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of Biosurfactants: In: **Biosurfactants and Biotechnology**, ed. N. Kosaric, W.L. Cairns & N.C.C. Gray. Marcel Decker, New York, N.Y. p. 89-120, 1987

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

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

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.1, n.2, p.87-107, 1984.

ZHANG, Y.; MILLER, R.M.; Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60 n. 6, p.2101-2106, 1994.