

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

“ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR
Pseudomonas aeruginosa.”

VINÍCIUS LUIZ DA SILVA

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

Rio Claro-SP

2018

VINÍCIUS LUIZ DA SILVA

**“ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR
Pseudomonas aeruginosa.”**

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

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientadora: Dra. Roberta Barros Lovaglio

Rio Claro

2018

S586"	Silva, Vinícius Luiz "Estudo do metabolismo dos ramnolipídios produzidos por pseudomonas Aeruginosa. / Vinícius Luiz Silva. -- Rio Claro, 2018 167 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Jonas Contiero Coorientadora: Roberta Barros Lovaglio 1. Biossurfactantes. 2. Pseudomonas aeruginosa. 3. Ramnolipídios. 4. Biorremediação. 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.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR
Pseudomonas aeruginosa

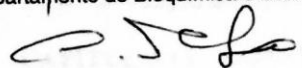
AUTOR: VINICIUS LUIZ DA SILVA

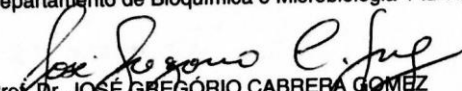
ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

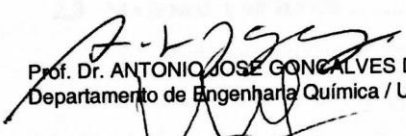
COORIENTADORA: ROBERTA BARROS LOVAGLIO

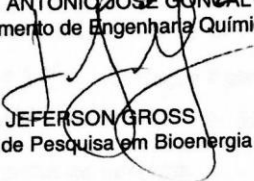
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. JOSÉ GREGÓRIO CABREIRA GOMEZ
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ GONÇALVES DA CRUZ
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. JEFERSON GROSS
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / UNESP

Rio Claro, 21 de novembro de 2018

Dedico esse trabalho aos meus pais, Adevair P. da Silva e Sônia E. Luiz
que mesmo com todas as adversidades da vida sempre me deram
suporte, moral e emocional, pra continuar minha caminhada rumo ao
conhecimento e crescimento pessoal, sei que esse é só o começo mais
obrigado por me trazerem até aqui com muito incentivo e carinho.
A minha esposa Camila A. Kuhl da Silva que me acompanhou no
momento mais assustador e prazeroso da minha vida até agora, sua
companhia é essencial para que eu siga caminhando. Obrigado aos três
por todo amor, afinal ele é a única coisa realmente essencial nessa vida

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a **DEUS**, força motriz de todas as coisas, por me impulsionar permitindo-me ter forças pra levantar todas as manhãs, mesmo que às vezes me faltasse forças e o medo de não ser capaz seguido da insegurança me consumissem por dentro, obrigado pela tua luz pela tua força e por me mostrar que nada sou sem a sua presença em meu coração. Aos meus pais Adevaire Sônia pelo incentivo, força e apoio, nessa jornada de estudos e aventura, sou grato por tudo que você fizeram por mim e ainda fazem mais principalmente pelo amor, pelas broncas e pelos valores que incutiram em mim, se um dia eu falhar em ser um bom homem será o maior dos fracassos, pois meu ponto de partida e meus exemplos foram os melhores possíveis, amo vocês!!! Agradeço ao meu orientador professor Dr. Jonas Contiero pelos 10 anos de trabalho, confiança e principalmente aprendizado. A minha Co-orientadora Dr. Roberta Barros Lovaglio, Rô obrigado por me guiar pelos caminhos da ciência e principalmente pela amizade e conselhos valorosos, isso que é mãe científica!!! Obrigado Lê, por ser esse amigo e parceiro que você é... Qual praia vamos agora??? Kkkk e Theozinho obrigado por eu poder ser o seu Tio Vini te amo mocinho. Obrigado também aos amigos de laboratório LMI e IPEBEN por contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional . Os técnicos do departamento de bioquímica e microbiologia Beto, Adriano, Fátima e Carmem pelos reagentes emprestados pelas risadas no corredor e a todos os funcionários desse departamento em especial a Priscila e Samanta pelas pipocas e seções de conversa na cozinha. Aos amigos do departamento por compartilhar os momentos de alegria e tristeza, sushi e cerveja (em especial: Guilherme, Carol, Bill, Rubens, Dú, Marina e Gabi). Obrigado aos colegas do IAMB em Aachen, por me ensinarem novas técnicas de laboratório, uma outra postura pessoal e profissional e por todas aquelas cervejas ao fim do expediente, especialmente aos amigos Carl, Till, Ivan, Isabela e ao professor Dr. Lars

M. Blank, por me receber em seu laboratório e viabilizar a conclusão desse projeto. Obrigado aos meus familiares por todo o apoio e carinho ao longo dessa jornada e pela compreensão da minha ausência por algumas vezes amo vocês!!! Agradeço ainda a minha esposa Camila Antonia Kuhl da Silva, por ser essa parceira incrível que você é e apoiar os meus sonhos e loucuras, sendo muitas vezes a força que eu preciso para superar meus medos e desafios e sabe pensando bem amor sem você essa tese nunca existiria, TE AMO!!! “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”. E obrigado a Ciência que me possibilitou expandir os horizontes me levando a lugares nunca antes imaginados, que eu possa retribuir gerando conhecimento e possibilitando assim o nascimento de mais um degrau nessa escada que leva a caminhos impensáveis.

**“Nossa maior fraqueza está em desistir.
o caminho mais seguro para o sucesso é
sempre tentar apenas uma vez mais.”**

Thomas Edison

RESUMO

Surfactantes são moléculas anfipáticas, que devido à presença de regiões com polaridades distintas apresentam propriedades únicas como a capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial. Os biosurfactantes são moléculas biológicas que podem ser sintetizados por uma ampla gama de seres vivos, no entanto os produtores mais estudados são os micro-organismos. Apesar das inúmeras vantagens dos tensoativos biológicos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e alta estabilidade, estes compostos não são amplamente utilizados, devido ao custo de produção. Por esse motivo, o presente estudo realizou a construção de linhagens mutantes, com a deleção de genes específicos, *rhlG* e *rhlYZ* e o mutante com a deleção dupla. Posteriormente foram realizados bioprocessos em biorreator, utilizando óleo de girassol e glicerol como fonte de carbono. Esses cultivos permitiram verificar a influência de cada um dos genes na biossíntese dos ramnolipídios. Os dados dos cultivos foram utilizados ainda para traçar os fluxos metabólicos das diferentes linhagens de *P. aeruginosa* MPAO1, a fim de entender melhor o metabolismo dos ramnolipídios e gerar dados para discussão de modificações genéticas dirigidas que visem o aumento da produção. Verificou-se ainda uma nova aplicação para esses glicolipídios, visando a remoção de azocorantes de soluções aquosas. Os cultivos permitiram inferir que o gene *rhlG* não é essencial para a produção dos ramnolipídios, pois sua deleção não resultou em queda na produção dos ramnolipídios, já o operon *rhlYZ* se mostrou necessário para a produção de ramnolipídios quando a fonte de carbono empregada foi hidrofóbica. As análises de fluxo levaram a inferir que a porção hidrofílica seja o gargalo na produção desses biotensoativos. Além disso estudou-se a adsorção do corante têxtil utilizando os ramnolipídios como adsorvente, demonstrou que essas biomoléculas apresentam potencial de biorremediação dos corantes em solução aquosa, a adsorção foi melhor em pHs ácidos

Palavras chaves:

Ramnolipídios, corantes, biorremediação, Análise de fluxo metabólico, *Pseudomonas aeruginosa*, glicolipídios, surfactantes, biosurfactantes.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules, which due to the presence of regions with distinct polarities present unique properties such as the ability to reduce surface and interfacial tension. Biosurfactants are biological molecules that can be synthesized by a wide range of living beings, however the most studied producers are microorganisms. Despite the numerous advantages of biological surfactants, such as low toxicity, biodegradability and high stability, these compounds are not widely used because of the cost of production. For this reason, the present study carried out the construction of mutant lines, with the deletion of specific genes, *rhlG* and *rhlYZ* and the mutant with the double deletion. Subsequently, bioprocesses were performed in bioreactor, using sunflower oil and glycerol as carbon source. These cultures allowed to verify the influence of each of the genes in the biosynthesis of the rhamnolipids. The culture data were also used to trace the metabolic fluxes of the different *P. aeruginosa* MPAO1 strains in order to better understand the metabolism of rhamnolipids and to generate data for the discussion of directed genetic modifications aimed at increasing production. A further application for these glycolipids has been found to remove azocorates from aqueous solutions. The cultures allowed to infer that the gene *rhlG* is not essential for the production of the rhamnolipids, since its deletion did not result in a decrease in the production of the rhamnolipids, whereas the *rhlYZ* operon was necessary for the production of rhamnolipids when the carbon source used was hydrophobic. Flow analyzes have led us to infer that the hydrophilic portion is the bottleneck in the production of these biotensioativos. In addition the adsorption of the textile dye was studied using the rhamnolipids as adsorbent, it was demonstrated that these biomolecules present bioremediation potential of the dyes in aqueous solution, the adsorption was better at acidic pHs

Keywords:

Ramnolipids, dyes, bioremediation, Metabolic flow analysis, *Pseudomonas aeruginosa*, glycolipids, surfactants, biosurfactants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estruturas química básicas dos ramnolipídios, RL1 e RL3, 2 moléculas de ramnose ligadas a 2 e 1 cadeia de ácidos graxos respectivamente , RL2 e RL4 1 molécula de ramnose ligada a 2 e 1 cadeias de ácidos graxos respectivamente.	23
Figura 2: Desenho esquemático do plasmídios pMEG (A) antes e (B) após a digestão pela enzima XBAI.	49
Figura 3: Figura representando as ligações das regiões TS1 e TS2 no backbone do plasmídio digerido com a enzima XBAI.....	51
Figura 4: Esquema do plasmídios pEMG mostrando a localização dos primers BW013 e BW014.....	53
Figura 5: Esquema do mapeamento da inserção do plasmídio no genoma bacteriano (os primers wj13 e wj14 são variáveis para cada fragmento de interesse, uma vez que são os primers usados para amplificar as regiões TS de interesse).....	55
Figura 6: Esquema explicando como ocorre a deleção após a clivagem do DNA genômico ser promovida pela enzima de restrição SclI produzida devido a inserção do plasmídio PSW-2.....	56
Figura 7: Gel das regiões TS1 e TS2 do operon <i>rhlYZ</i> e do gene <i>rhlG</i>	58
Figura 8: (A) esquema do plasmídios pMEG digerido (B) Gel do plasmídios digerido.....	59
Figura 9: modelo dos plasmídios após a reação de Gibson (A) pMEG contendo as regiões TS1 e 2 do gene <i>rhlG</i> (B) pMEG contendo as regiões TS1 e 2 dos genes <i>rhlY</i> e <i>rhlZ</i> .	60
Figura 10: PCR de colônia dos clones de <i>E.coli</i> (A) contendo o plasmídio pMEG e as regiões TS do gene <i>rhlG</i> (B) contendo o plasmídios pMEG com as regiões TS do operon <i>rhlYZ</i>	61
Figura 11: Mapas dos alinhamentos entre o DNA extraído e as sequencias bases elaborado no SnapGen (A) Mapa referente ao plasmídio contendo as regiões TS dos genes <i>rhlYZ</i> (B) mapa referente ao plasmídio com as regiões adjacentes do gene <i>rhlG</i>	62
Figura 12: Confirmação da inserção do plasmídio no genoma bacteriano. (A) Clones contendo o plasmídio pEMG e as regiões TS1 e 2 do gene <i>rhlG</i> . (B) Clones contendo o plasmídio e as regiões adjacentes aos genes <i>rhlYZ</i>	63
Figura 13: Forma de inserção que apresenta os fragmentos menores quando utilizados os primers wj13_ <i>rhlG</i> e BW013 resultando em um fragmento de 2155pb.....	64
Figura 14: figura exemplificando o sceening dos clones de <i>P. aeruginosa</i> após a inserção do plasmídio PSW-2 e a deleção do gene de interesse.....	66

Figura 15: Esquema demonstrando as regiões a serem amplificadas na linhagem selvagem e na linhagem com a deleção do gene <i>rhlG</i>	67
Figura 16: Gel demonstrando o resultado final da reação de PCR das regiões onde deveria estar o gene de <i>rhlG</i> , para verificar o sucesso da deleção do gene <i>rhlG</i>	68
Figura 17: Esquema demonstrando as regiões a serem amplificadas na linhagem selvagem e na linhagem com a deleção dos genes <i>rhlYZ</i>	69
Figura 18: Gel demonstrando o resultado final da reação de PCR das regiões onde deveria estar o operon <i>rhlYZ</i> , para verificar o sucesso da deleção do operon <i>rhlYZ</i>	70
Figura 20: Fermentador montado no início da fermentação ilustrando o setup do processo.	80
Figura 20: Cinética de produção de ramnolipídios da linhagem selvagem (<i>P. aeruginosa</i> MPAO1) utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.	84
Figura 21: Perfil de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de óleo de girassol da linhagem com a deleção no gene <i>rhlG</i>	85
Figura 22: Cinética de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de óleo de girassol da linhagem com a deleção do operon <i>rhlYZ</i>	86
Figura 24: Perfil do bioprocessos, apresentando o consumo de óleo de girassol, o crescimento microbiano e a produção de ramnolipídios, quando utilizada linhagem <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlG</i> Δ <i>rhlYZ</i>	88
Figura 25: Cinética de produção consumo e crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 utilizando glicerol como fonte de carbono.	89
Figura 26: Perfil de produção consumo e crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlG</i> utilizando glicerol como fonte de carbono.	91
Figura 27: Perfil cinético do mutante <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlYZ</i>	92
Figura 28: Perfil cinético do mutante <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlYZ</i> Δ <i>rhlG</i>	93
Figura 29: Figura apresentando os fluxos metabólicos dos bioprocessos realizados utilizando óleo de girassol como fonte de carbono. A legenda no canto superior da figura mostra que cada cor de fluxo representa uma linhagem diferente.	97
Figura 30: Figura apresentando os fluxos metabólicos dos bioprocessos realizados utilizando glicerol como fonte de carbono. A legenda no canto superior da figura mostra que cada cor de fluxo representa uma linhagem diferente.	102
Figura 31: Concentração residual do corante Direct Orange 2GL após a remoção utilizando ramnolipídios em diferentes concentrações de pH.	115

Figura 32: Gráfico do espectro de remoção do corante Direct Orange 2GL variando a concentração de ramnolipídios.	117
Figura 33: Remoção do corante utilizando diferentes concentrações de ramnolipídios, da esquerda para a direita as concentrações utilizadas foram: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25 e 2,12 mg/ml de ramnolipídios.....	118
Figura 34: Gráfico do estudo cinético da remoção do corante Direct Orange 2GL utilizando ramnolipídios como adsorvente.....	118
Figura 35: difusão intra-particular.....	121
Figura 36: Corante adsorvido aos ramnolipídios e precipitado antes do teste de recuperação do corante (dessorção).....	129
Figura 37: corante e desadsorvido do biossurfactante após processo de alcalinização do pH.	130
Figura 38: Espectro do corante Direct Orange 2GL antes da adsorção.....	131
Figura 39: Estrutura química do corante Direct Orange 2GL.	131
Figura 40:Espectro dos ramnolipídios antes da adsorção.....	132
Figura 41: Espectro do corante antes e depois da adsorção utilizando ramnolipídios.	134
Figura 42: Possíveis interações entre o corante Direct Orange 2GL e uma molécula de ramnolipídios.	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela dos primers utilizados para amplificação da região TSI e TS2 do gene <i>rhlG</i>	50
Tabela 2: Tabela dos primers utilizados para amplificação da região TSI e TS2 dos genes <i>rhlYZ</i>	50
Tabela 3: Velocidades específicas de crescimento, calculadas e obtidas pelo modelo em todos os bioprocessos.	95
Tabela 4: Fluxo obtidos em cada ciclo da β -oxidação pelas diferentes linhagens nos bioprocessos utilizando óleo de girassol.	99
Tabela 5: Valores dos fluxos de síntese de ácidos graxos, obtidos nos bioprocessos utilizando óleo de girassol, para todas as linhagens estudadas.	100
Tabela 6: Quantidade de HAAs produzida com 37 horas de bioprocessos utilizando Óleo de girassol como fonte de carbono.	101
Tabela 7:Valores dos fluxos de síntese de ácidos graxos, obtidos nos bioprocessos utilizando glicerol, para todas as linhagens estudadas.	104
Tabela 8: Resultado dos estudos de cinética de remoção do corante Direct Orange 2GL utilizando ramnolipídios.	120
Tabela 9: Resultado dos parâmetros de isotermas.....	125
Tabela 10: Resultados dos estudos de termodinâmica.	128
Tabela 11: Valores do teste de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> antes e depois da adsorção.	138

1 SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1	BIOSURFACTANTES	21
1.1.1	<i>Classificação e estrutura dos biosurfactantes</i>	<i>21</i>
1.2	BIOSSÍNTESE DOS BIOSURFACTANTES	24
1.3	REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE	28
1.4	BALANÇO DE MASSA.....	30
1.5	APLICAÇÕES DOS BIOSURFACTANTES	31
1.5.1	<i>Função biológica dos biosurfactantes</i>	<i>31</i>
1.5.2	<i>Biosurfactantes na medicina</i>	<i>32</i>
1.5.3	<i>Aplicações na agroindústria.....</i>	<i>34</i>
1.5.4	<i>Biorremediação</i>	<i>35</i>
1.5.5	<i>Outras aplicações</i>	<i>37</i>
1.6	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	37
1.6.1	<i>Substratos alternativos</i>	<i>38</i>
1.6.2	<i>Fatores que influenciam a produção.....</i>	<i>39</i>
1.6.3	<i>Melhoramento de linhagens</i>	<i>41</i>
1.6.4	<i>Produção em biorreatores.....</i>	<i>42</i>
2	CAPÍTULO II – CONSTRUÇÃO DAS CEPAS MUTANTES DE <i>P. AERUGINOSA</i>.	45
2.1	INTRODUÇÃO	46
2.2	OBJETIVO	47
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.3.1	<i>Micro-organismo utilizado</i>	<i>47</i>
2.3.2	<i>Procedimento de deleção dos genes de interesse</i>	<i>48</i>
2.3.2.1	<i>Extração e purificação do DNA genômico.....</i>	<i>48</i>
2.3.2.2	<i>Construção do plasmídio pMEG contendo as regiões adjacentes aos genes de interesse</i>	<i>48</i>
2.3.2.2.1	<i>Amplificação das regiões adjacentes aos genes de interesse.....</i>	<i>49</i>
2.3.2.3	<i>Reação de Gibson</i>	<i>51</i>
2.3.2.4	<i>Inserção dos plasmídios na bactéria e incorporação no DNA genômico utilizando o mating triparental.....</i>	<i>51</i>

2.3.2.5	Inserção do plasmídeos PSW2.....	55
2.3.2.6	Remoção do plasmídeos PSW2	57
2.3.2.7	Softwares utilizados.....	57
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
2.5	CONCLUSÃO	71
3	CAPITULO III - ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDIOS	
	PRODUZIDOS POR <i>P. AERUGINOSA</i>.	72
3.1	INTRODUÇÃO.....	73
3.2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	76
3.3	OBJETIVOS.....	76
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3.4.1	<i>Micro-organismos utilizados</i>	77
3.4.2	<i>Meios de cultura</i>	77
3.4.2.1	Caldo Lisogênico (LB)	77
3.4.2.2	Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTP).....	77
3.4.2.3	Meio Mineral livre de cálcio	78
3.4.3	<i>Condições de cultivo</i>	78
3.4.3.1	Preparo do Inóculo	78
3.4.3.2	Biorreator.....	79
3.4.4	<i>Métodos Analíticos</i>	81
3.4.4.1	Amostras.....	81
3.4.4.1.1	Quantificação de Ramnolipídios	81
3.4.4.1.2	Quantificação do Óleo de Girassol.....	82
3.4.4.1.3	Quantificação da Biomassa	82
3.4.5	<i>Análise de Balanço de Fluxo</i>	82
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.5.1	<i>Bioprocessos utilizando óleo de girassol como fonte de carbono</i>	83
3.5.2	<i>Bioprocessos utilizando glicerol como fonte de carbono</i>	89
3.5.3	<i>Análise de balanço de fluxo nas rotas envolvidas na produção de ramnolipídios pelas linhagens <i>P. aeruginosa</i> MPAO1, <i>P. aeruginosa</i> MPAO1ΔrhIG, <i>P. aeruginosa</i> MPAO1ΔrhLYZ e <i>P. aeruginosa</i> MPAO1ΔrhIGΔrhLYZ utilizando óleo de girassol como fonte de carbono</i>	94
3.6	CONCLUSÃO	105

4	CAPITULO IV- APLICAÇÃO DOS RAMNOLIPÍDIOS: ADSORÇÃO DE CORANTES TEXTÉIS UTILIZANDO RAMNOLIPÍDIOS.	106
4.1	INTRODUÇÃO.....	107
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	109
4.2.1	<i>Micro-organismo</i>	109
4.2.2	<i>Meios de cultura</i>	109
4.2.2.1	Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato.....	109
4.2.2.2	Meio Mineral livre de cálcio	110
4.2.2.3	Extração e purificação dos ramnolipídios	110
4.2.3	<i>Experimentos de adsorção</i>	111
4.2.3.1	Estudos de cinética e equilíbrio	112
4.2.3.2	Recuperação do corante após a adsorção	113
4.2.3.3	Análise em espectrofotometria FT-IR	114
4.2.3.4	Teste de toxicidade após a remoção do corante	114
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	115
4.3.1	<i>Experimentos de adsorção</i>	115
4.3.2	<i>Cinética e equilíbrio</i>	118
4.3.2.1	Estudos de equilíbrio	123
4.3.3	<i>Recuperação do corante após a adsorção</i>	128
4.3.4	<i>Análise em FT-IR</i>	130
4.3.4.1	Teste de toxicidade utilizando <i>Daphnia similis</i>	137
4.4	CONCLUSÃO	139
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

2.1 BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes são compostos de origem biológica, produzidos por uma ampla gama de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estes compostos são constituídos por uma porção hidrofóbica, usualmente uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica que pode ser um éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxilato ou carboidrato (CAMEOTRA ; MAKKAR, 1998).

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

2.1.1 Classificação e estrutura dos biossurfactantes

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

Os biossurfactantes podem também ser classificados de acordo com a sua massa molecular: os de baixa massa molecular (glicolipídios, lipopeptídeos e fosfolipídios) e de alta massa molecular (biossurfactantes poliméricos e particulados). Esta diferença confere diferentes propriedades a esses bioprodutos de tal maneira que, os tensoativos de

baixa massa apresentam maior atividade superficial, já os de alta massa exercem melhor atividade de emulsificação (ROSENBERG; RON, 1999).

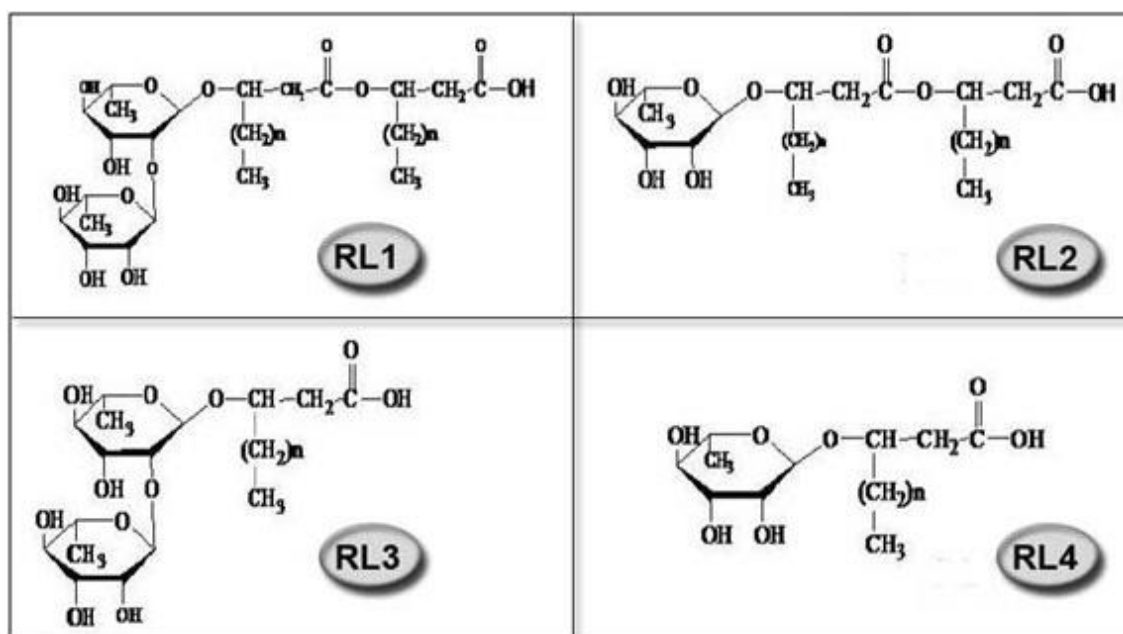
De acordo com a revisão bibliográfica apresentada por Muthusamy et al, (2008) grande parte dos biossurfactantes conhecidos são os glicolipídios. Sendo estes constituídos basicamente por carboidratos ligados a ácidos alifáticos ou hidroalifáticos, unidos através de uma ligação do tipo éter ou éster. Dentro desse grupo os biossurfactantes mais conhecidos são: soforolipídios, trealoselipídios e os ramnolipídios.

Os glicolipídios sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* são denominados ramnolipídios, cuja porção hidrofílica é constituída por uma ou duas moléculas de ramnose e a região hidrofóbica por uma ou duas cadeias lipídicas (moléculas de 3 hidroalcanoatos) (LANG; WAGNER, 1987). A capacidade de produção de ramnolipídios por bactérias desse gênero foi primeiramente descrita por Jarvis e Johnson, (1949). Os biotensioativos produzidos por linhagens de *P. aeruginosa* podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m (ABALOS et al, 2001) e sua concentração micelar crítica está entre 5 – 200 mg/L (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os ramnolipídios têm sido bem estudados e são reportados como uma mistura de espécies homólogas de RL1 (Rha2C10C10), RL2 (RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) e RL4 (RhaC10) (LANG e WAGNER, 1987). Os principais homólogos de ramnolipídios são os mono-ramnolipídios, que possuem uma unidade de ramnose e duas cadeias lipídicas (exemplo: Rha-C10-C10) e os di-ramnolipídios, que contém duas unidades de ramnose ligada a duas cadeias lipídicas (exemplo: RHA-Rha-C10-C10) (NITSCHKE et al, 2005b; SOBERON-CHAVEZ et al, 2005; MULLIGAN, 2005).

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

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



Fonte: Modificado de (LOVAGLIO, 2011).

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

Na literatura há uma divergência, quando se trata de qual o tipo predominante de homólogo. Para alguns autores os principais ramnolipídios secretados por *P. aeruginosa* são os mono-ramnolipídios (ARINO et al, 1996; SIM et al, 1997). Porém existem relatos

afirmando que a maioria dos homólogos produzidos são di-ramnolipídios (DEZIEL et al, 2000, MATA-SANDOVAL et al, 2001; BENINCASA et al, 2004).

A composição e distribuição de homólogos em uma mistura de ramnolipídios são determinadas pela linhagem bacteriana, condições de cultivo e composição do meio de cultura. Já as propriedades do biossurfactante produzido dependem da quantidade e tipo de homólogos presentes (GUERRA SANTOS et al, 1984). Outra molécula com atividade de superfície produzida por *P. aeruginosa* são os ácidos 3-hidroxi-*alcanoil*-*alcanolox*y (3-HAA), tais compostos são precursores da região hidrofóbica dos ramnolipídios (RIKALOVIC et al, 2013).

2.2 BIOSSÍNTESE DOS BIOSSURFACTANTES

A estrutura anfipática dos biossurfactantes compreende uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, em muitos casos a síntese das porções hidrofílicas e hidrofóbicas deriva diretamente do metabolismo primário. As rotas para a síntese desses precursores são diversas e utilizam grupos específicos de enzimas, que em muitos casos, além de participarem da síntese, atuam também como enzimas regulatórias (DESAI ; BANAT, 1997).

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

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

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

Olvera et al., (1999) concluíram que a conversão biossintética de glicose em ramnose ocorre através da ação da fosfoglicomutase AlgC, já que mutantes algC não produziram ramnolipídios. Essa enzima converte D-glicose-6-fosfato em D-glicose-1-fosfato, a qual é usada por RmlA, RmlB, RmlC e RmlD para produzir dTDP-L-ramnose (OLVERA et al., 1999; ROBERTSON et al., 1994). A síntese de ramnose a partir da oxidação de lipídios fornecidos como fonte de carbono, pode ocorrer a partir do ciclo do glioxilato, onde acetil-CoA, formada na β -oxidação se une ao Glioxilato, que é transformado em malato pela malato sintase. O malato é oxidado à oxalacetato que pela gliconeogênese é convertido em hexoses e posteriormente à ramnose.

Em relação à biossíntese da porção hidrofóbica dos ramnolipídios, Campos-Garcia et al., (1998) relatam a existência do gene rhlG, cuja proteína apresenta homologia com NADPH-cetoacil redutases envolvida na síntese de ácidos graxos. Os autores descrevem que a deleção do gene rhlG, não acarretou em mudanças na taxa de crescimento e conteúdo total de lipídios de *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto a produção de ramnolipídios foi totalmente anulada, o que os levou à conclusão de que a proteína RhlG seria responsável pela síntese da porção lipídica dos ramnolipídios.

Déziel et al., (2003) apresentaram evidências de que o gene *rhlA* está envolvido na síntese dos ácidos 3-hidroxiálcanoil-alcánolox (3-HAA), que são os precursores lipídicos dos ramnolipídios e substrato da ramnosiltransferase 1 (RhlB). Eles observaram que em mutantes com deleção nos genes *rhlA* e *rhlB* não havia produção de 3-HAAs e ramnolipídios, respectivamente. A homologia de RhlA com transacilases, como a PhaG envolvida na síntese de poli-hidroxiálcanoatos (PHA), levou os autores a proporem que RhlA é uma transacilase que catalisa a transferência do β -hidroxidecanoil associado à proteína carreadora de acila (ACP) para a coenzima A (CoA).

Zhu and Rock, (2008) corroboraram com os resultados de Déziel et al., (2003) propondo que só ocorre formação de 3-HAA na presença de RhlA. Esses autores encontraram que a estereoquímica dos β -hidroxiácidos dos ramnolipídios corresponde a intermediários da biossíntese dos ácidos graxos e não a intermediários da β -oxidação, sugerindo que a porção lipídica é sintetizada através da clássica rota de síntese de ácidos graxos a partir de duas unidades de carbono (FASII), sugerindo ainda que o substrato preferencial dessa enzima é β -hidroxidecanoil-ACP, pois ao utilizar β -hidroxidecanoil-CoA não houve síntese de ácido 3-hidroxiálcanóico, mesmo em uma concentração de RhlA dez vezes mais alta. Este estudo levantou dúvidas sobre a hipótese apresentada por Campos-García et al., (1998) de que o gene *rhlG* seria responsável pela síntese do precursor lipídico dos ramnolipídios, pois mutantes com deleção em *rhlG* produziram concentrações de ramnolipídios próxima aquelas sintetizadas pelas linhagens selvagens. Dessa maneira a função do gene *rhlG* permanece desconhecida. Porém o trabalho realizado por Lovaglio (2011) demonstrou que a produção de ramnolipídios é afetada negativamente pela ausência desse gene uma vez que a produção de ramnolipídios nesse trabalho pela cepa *P. aeruginosa* Δ *rhlG* foi inferior quando comparada a outras linhagens.

Dessa maneira o estudo comparativo do fluxo de carbono dessa linhagem (*P. aeruginosa* Δ rhlG) com a sua cepa selvagem pode levar a uma elucidação da função do gene *rhlG*.

Há ainda uma divergência na literatura com relação ao papel da β -oxidação na síntese da região hidrofóbica dos ramnolipídios. Zhang e JU et al, (2012) verificaram que tanto a síntese *de novo* quanto a β -oxidação são responsáveis pela síntese dos precursores lipídicos dos ramnolipídios. Nesse trabalho, os autores realizaram dois tipos de experimentos: utilizaram em um experimento a 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* (cujá proteína participa da última etapa da β -oxidação) e de 200 a 600 vezes na expressão dos genes *rhlAB* relacionados à biossíntese de ramnolipídios. Através da análise de espectrometria de massa, determinou-se o padrão de incorporação de deutério, oriundo do ácido octadecanóico d_{35} , foi observado que o homólogo 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 (ZHANG; JU, 2012).

ABDEL-Mawgoud et al, (2014) relataram que a β -oxidação é a fonte predominante do ácido 3-hidroxiálcanóico principal precursor da parte lipídica dos ramnolipídios. Os autores relatam queda na produção de ramnolipídios, quando há inibição da β -oxidação, mesmo quando a fonte de carbono empregada é hidrofílica. Os autores relatam ainda a importância de outros dois genes na produção desse biossurfactante sendo eles os genes *rhlY* e *rhlZ*, esse genes estão localizados um após o outro no genoma da *P. aeruginosa*, em um pequeno operon, tal estudo demonstrou que esse operon é fundamental para produção de ramnolipídios, pois quando um ou ambos estão ausentes a produção desse metabólito microbiano cai consideravelmente abdel-

mawgoud et al, (2014), portanto é importante um estudo de análise de fluxo de carbono comparando a cepas Δ rhlYZ e a selvagem, afim de entender mais sobre o papel desse operon na produção de ramnolipídios uma vez que o trabalho realizado por abdel-Mawgoud et al, (2014) foi o único a investigar a importância desses genes na produção dessa molécula. Tal investigação pode ajudar a traçar estratégias de engenharia molecular que possibilitem o aumento na produção desse importante biossurfactante que vem sendo estudado a mais de 60 anos.

Sumarizando, primeiramente ocorre a biossíntese dos precursores do ramnolipídios: dTDP-L-ramnose e β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato. Na próxima etapa eles são unidos pela ramnosiltransferase 1, codificada pelo gene rhlB, formando o mono-ramnolipídio (RL2), parte destas moléculas são excretadas (assim como pode ocorrer com seus precursores 3-HAAs), uma outra porção recebe mais uma molécula de ramnose, através da ação da ramnosiltransferase codificada pelo gene rhlC.

2.3 REGULAÇÃO DA BIOSSÍNTESE

Além da complexa rede de genes envolvidos na produção dos ramnolipídios por *P. aeruginosa*, existe ainda uma intrincada regulação por trás da produção desse biossurfactante. A fim de compreender melhor essa regulação é necessário perceber que a função dos ramnolipídios para a bactéria produtora é bastante diversa. Esses metabólitos microbianos favorecem seus produtores na competição por nichos ecológicos, pois facilitam o acesso e consequentemente a degradação de fontes de carbono hidrofóbicas, podem ainda atuar como antimicrobiano ajudando a eliminar competidores (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2011). Os ramnolipídios são considerados também como um fator de virulência, pois ajudam as bactérias *P. aeruginosa* a romper as células epiteliais humanas durante o início da infecção de paciente com fibrose cística (ZULIANELLO et al., 2006).

A produção de muitos fatores de virulência e metabólitos secundários é regulada em conjunto com a densidade celular através de um sistema denominado quorum sensing (LATIFI et al., 1996). O quorum sensing é caracterizado pela produção de compostos difusíveis denominados autoindutores, que se acumulam com o aumento da densidade populacional, promovendo interação celular e ativação de reguladores transcricionais (FUQUA; GREENBERG, 1998; SALMOND et al., 1995; WILLIAMS, 2007).

As linhagens de *P. aeruginosa* apresentam dois sistemas de quorum sensing (QS), o las e o rhl. Os complexos RhlR/RhlI e LasR/LasI (proteína regulatória/ autoindutor) modulam a transcrição de 5-10% de todo o genoma de *P. aeruginosa* (DEKIMPE ; DÉZIEL, 2009). Uma terceira molécula sinal, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona ou *Pseudomonas* quinolona sinal (PQS), atua como uma ponte entre os sistemas de quorum sensing las e rhl. A proteína regulatória LasR é requerida para a biossíntese de PQS, enquanto RhlR promove a ativação desta molécula (WAGNER et al., 2008). De acordo com Juhas et al., (2005) existem reguladores adicionais que controlam os circuitos de quorum sensing, las e rhl, através do ajuste das respostas desses sistemas.

Dekimpe e Déziel (2009) revisaram a proposta de que LasR seria o regulador mestre na hierarquia clássica de quorum sensing. Os resultados apresentados pelos autores mostraram que a atividade do sistema rhl não é anulada, e sim expressa tardiamente em mutantes *lasR*, permitindo, desta maneira, a expressão de fatores de virulência como a piocianina, ramnolipídios e homoserina lactona durante a fase estacionária de crescimento. Além disso, nesta fase de crescimento, RhlR ativa funções específicas controladas por LasR, como 3-oxo-C₁₂-homoserina lactona e *Pseudomonas* quinolona sinal (PQS), sendo capaz de contornar a ausência do sistema las. Estes resultados demonstram que o modelo da hierarquia do sistema QS é mais complexo do que àquele que propõe a sobreposição da ação de las ao sistema rhl.

Isso deixa evidente a complexidade do sistema que regula a biossíntese dos ramnolipídios, e a necessidade de um conhecimento mais aprofundado do metabolismo bacteriano a fim de promover um novo salto na produção desse biossurfactante promissor.

Essa linha de raciocínio está de acordo com Müller e Hausman., (2011) que afirma que para ampliar o desenvolvimento do processo de produção de ramnolipídios, há necessidade de informações detalhadas sobre a regulação da produção de ramnolipídios durante cultivos em biorreator e assim, delinear estratégias baseadas no conhecimento genético e de engenharia de processos.

2.4 BALANÇO DE MASSA

A modelagem de sistemas biológicos é bastante complexa, pois eles não seguem leis rígidas, diferente dos modelos eletrônicos, físicos e químicos. Porém esses sistemas estão submetidos a algumas regras, como a lei de conservação de massa (Varma; Paison, 1993).

O balanço de massa é uma ferramenta indispensável para analisar o equilíbrio de reações químicas e biológicas. Essa abordagem é uma poderosa ferramenta a fim de avaliar o destino do carbono em um bioprocessos (Varma; Paison, 1993).

A realização do balanço de massa leva a conhecimentos, que possibilitam a otimização tanto da linhagem, como do bioprocessos, estabelecendo assim altos rendimentos do produto e boas taxas de conversão. O conhecimento do fluxo de carbono pode facilitar a detecção de desvios no metabolismo microbiano que levem a formação de subprodutos indesejados no processo (BUCHHOLZ et al., 2013). A análise de fluxo metabólico é uma ferramenta que aliada às ferramentas denominadas ômicas (genômica, proteômica e metabolômica), pode ajudar a desenhar novas linhagens para aplicação industrial, uma vez que a mesma realiza uma integração final entre a expressão gênica,

concentração proteica, cinética das proteínas, regulação e as concentrações de metabólitos. Sendo assim esse tipo de análise pode ser ainda denominada fluxômica (KRÖMER et al., 2014).

2.5 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

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

Os biossurfactantes possuem diversas aplicações na indústria, incluindo cosméticos, formulações farmacêuticas, indústria agrícola, alimentícia, recuperação de petróleo e biorremediação (KITAMOTO et al, 2002; SANDRIN et al, 2000; RAHMAN et al, 2003; LIU et al, 2017).

2.5.1 Função biológica dos biossurfactantes

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

Outro possível papel dos biossurfactantes para seus produtores é que, tais metabólitos favoreceriam a absorção e degradação de hidrocarbonetos, porém a produção dos surfactantes biológicos não está necessariamente atrelada à degradação de hidrocarbonetos uma vez que esses metabólitos microbianos podem ser produzidos

mesmo na ausência de hidrocarbonetos e fontes oleosas. Há ainda a possibilidade da produção de biossurfactantes estar relacionada a condições de estresse, em que ele serviria para a proteção das células microbianas (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2011).

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

Outra função biológica atribuída aos ramnolipídios é a de solubilizar moléculas sinalizadoras produzidas por *P. aeruginosa* (PQS). Esse sinalizador é pouco solúvel em ambiente aquoso, tendo assim sua função comprometida em tais ambientes, porém, quando secretado, o ramnolipídio ajuda a solubilizar o PQS, aumentando consequentemente a bioatividade desse sinalizador (CALFEE et al, 2005).

2.5.2 Biossurfactantes na medicina

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

Gomes e Nitschke. (2012) relataram que a surfactina e o ramnolipídio podem ser usados não só para remover o biofilme já estabelecido, como também prover um tratamento de superfície de maneira a modificar as propriedades superficiais. Este tipo de

tratamento dificulta a formação posterior de filmes bacterianos gerados por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, que são patógenos, normalmente associados a alimentos, eliminando assim contaminações e evitando re-colonizações em superfícies, tanto em cozinhas como em ambientes hospitalares.

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

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

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

Outra aplicação dos ramnolipídios na área da saúde é seu uso como inseticida de origem biológica, frente ao *Aedes aegypti*. Esse metabólito microbiano foi eficiente contra a fase larval e o adulto dessa importante espécie de mosquito, transmisora de diversas arboviroses, de importância médica tais como: dengue, chikungunya, zika e febre amarela urbana. Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* apresentaram ainda capacidade de repelência frente ao *A. aegypti*, podendo assim serem empregados como uma eficiente ferramenta de prevenção as doenças transmitidas pelo mesmo seja pela sua atividade repelente ou pelo controle do vetor (SILVA et al, 2015a).

2.5.3 Aplicações na agroindústria

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

Há relatos de que os ramnolipídios podem ser utilizados para a proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinérea*, pois inibem a germinação de esporos, bem como o crescimento do micélio (VARNIER et al, 2009). Vatsa et al, (2010) relata em sua revisão a atividade antifúngica dos ramnolipídios contra diversos fungos patógenos de plantas, tais como *Botrytis sp*, *Rhizoctonia sp*, *Pythium sp*, *Phytophthora sp*. e *Plasmopara sp*.

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

Ainda relacionado à proteção de plantas contra seus patógenos, recentemente foi relatado que os ramnolipídios podem ativar o sistema imunológico de *Arabidopsis thaliana*. Quando em contato com esse biossurfactante a planta acumulou moléculas sinalizadoras e ativou os genes de defesa. Essa resposta participa da resistência contra

bactérias hemibiotróficas e também oomicetos biotróficos, tais como *Pseudomonas syringae* e *Botrytis cinérea* (SANCHEZ et al, 2012).

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

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

Outra aplicação dos biossurfactantes na agroindústria é a utilização dos ramnolipídios no tratamento de sementes, facilitando a germinação e o desenvolvimento das mesmas, o que pode facilitar a germinação de sementes dormentes (SILVA et al, 2015b).

2.5.4 Biorremediação

O potencial para o uso dos biossurfactantes na área de biorremediação vem sendo estudado há mais de 20 anos. Tais metabólitos microbianos podem ser empregados na limpeza de ambientes aquáticos e terrestres contaminados por petróleo, petroderivados e metais pesados (BANAT, 1995).

Costa et al, (2010) demonstraram o potencial dos ramnolipídios para a remoção de petróleo bruto de areias contaminadas. Nesse trabalho, observou-se uma remoção de até 98% do petróleo, utilizando o ramnolipídio comercial JBR599 (Jeneil Biosurfactant

Co., Saukville, USA) em sua concentração micelar crítica (CMC). Porém quando o ramnolipídio utilizado na lavagem da areia foi o denominado pelo autor como L2-1 a remoção de óleo foi menor atingindo um índice de 69% na CMC. Foi observado um aumento de 15% na taxa de remoção quando a concentração utilizada ultrapassou em 5% a CMC. Segundo os autores, dois mecanismos estão associados à remoção do petróleo, a mobilização que ocorre em concentrações inferiores a CMC e a solubilização que ocorre em concentrações superiores a CMC (COSTA et al,2010).

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

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

Segundo Liu et al. (2017), os biossurfactantes aumentam a biodegradação de hidrocarbonetos por micro-organismos atuando através da emulsão e solubilização dos hidrocarbonetos tornando-os mais biodisponíveis para os micro-organismos presentes no ambiente, eles podem ainda aumentar a atividade enzimática da microbiota e por consequência facilitar a biodegradação desses petroderivados (WANG et al., 2017).

Os ramnolipídios podem ainda ser utilizados para ajudar a promover a fitorremediação. Zhu e Zhang, (2008) avaliaram a influência dos ramnolipídios na remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por plantas do gênero *Lolium*

mostrado que em algumas concentrações a presença dos ramnolipídios favorece a remoção desses compostos pelas raízes das plantas.

2.5.5 Outras aplicações

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

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

Recentemente uma nova aplicação relatada para os ramnolipídios na área de limpeza diz respeito a limpeza de membranas de ultra filtração tais como as utilizadas na fabricação de queijos. O ramnolipídio se mostrou mais eficiente que o dodecil-sulfato de sódio na limpeza das membranas de ultra filtração, além de apresentar uma recuperação de 100% do fluxo inicial apresentado pela membrana (AGHAJANI et al, 2018).

A formação e estabilização de nano partículas de óxido de níquel, zircônia e prata utilizando ramnolipídios também vêm sendo estudada (PALANISAMY; RAICHUR, 2009; GANESH et al, 2010). As nano partículas construídas com o auxílio dos ramnolipídios apresentaram atividade antimicrobiana (GANESH et al, 2010).

2.6 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes de origem microbiana têm recebido um grande interesse, devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e ampla gama de aplicações. Apesar das vantagens apresentadas, os biotensoativos não são amplamente utilizados comercialmente devido aos altos custos de produção, associados à baixa produtividade e

ao uso de substratos caros. Três estratégias tem sido adotadas para tornar os custos do processo de produção mais baixo, dentre elas: (1) a utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo; (2) o desenvolvimentos de bioprocessos eficientes para produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo; (3) ou ainda o desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante (MUKHERJEE et al, 2006).

2.6.1 Substratos alternativos

Estima-se que a matéria-prima seja responsável por até 30% dos custos totais de produção em muitos processos biotecnológicos (MUKHERJEE et al, 2006). O uso de fontes de nutrientes alternativas para a síntese de biossurfactantes pode reduzir o problema econômico da produção desses bioproduto, para isso poderiam ser utilizados subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. A adoção desses resíduos contribui para a redução da poluição ambiental, agrega valor aos mesmos, além de evitar o descarte indevido no meio ambiente.

A indústria de óleo e gordura gera grandes quantidades de resíduos. Estes são provenientes tanto da extração como da utilização de óleos vegetais. Alguns estudos demonstraram que estas fontes de carbono alternativas podem ser utilizados como substratos por linhagens produtoras de ramnolipídios (BENINCASA et al, 2002; NITSCHKE et al, 2005a; COSTA et al, 2005; RAZA et al, 2007). Alguns autores relatam ainda o emprego de melaço de cana, resíduos da produção de queijo, batata e mandioca como fontes para a produção de biotensoativos (MUKHERJEE et al, 2006).

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

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

Outra fonte alternativa para a produção de ramnolipídios é o glicerol o qual tem sua oferta aumentada devido ao fato de ser um subproduto da produção do biodiesel. No Brasil desde 2008 a adição de 2% de biodiesel ao diesel convencional é obrigatória, em 2013 essa porcentagem subiu para 5%, levando a uma produção indireta ainda maior deste insumo. Na União Europeia, companhias de produção de biodiesel enfrentam problemas em relação ao excesso de glicerol produzido, devido ao custo de descarte e ao baixo valor agregado desse subproduto. A utilização do glicerol como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como a produção de biossurfactante, pode ajudar na redução do acúmulo desse subproduto e ainda favorecer a produção de biossurfactantes (SILVA et al, 2010b).

O bagaço da cana de açúcar, que também é um subproduto da indústria dos biocombustíveis, também tem sido utilizado para a produção de biotensoativos, como os glicolipídios produzidos por *Scheffersomyces stipitis* (MARCELINO et al, 2017).

2.6.2 Fatores que influenciam a produção

Entre os parâmetros que influenciam o tipo e a quantidade de produto formado estão: a natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e parâmetros físicos e químicos, como aeração, agitação, temperatura e pH (FIECHTER, 1992).

Elevadas proporções C/N (GUERRA-SANTOS et al, 1984; RAZA et al, 2007; WU et al, 2007; LOVAGLIO et al, 2010) e C/P (MULLIGAN et al, 1989) estimulam a síntese de ramnolipídios, enquanto altas concentrações de cátions bivalentes, especialmente ferro, são inibitórias (GUERRA-SANTOS et al, 1986; VENKATA et al, 1989). A utilização de NH_4^+ , glutamina, asparagina e arginina, como fonte de nitrogênio, inibem a produção de ramnolipídios, enquanto NO_3^- , glutamato e aspartato

promovem a síntese (MULLIGAN e GIBBS, 1989; VENKATA, RAMANA e KARANTH, 1989).

O nitrato é relatado como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios, pois estimula a expressão do gene *rhlAB*, um dos principais responsáveis pela síntese desse bioproduto (VENKATA, RAMANA E KARANTH, 1989; MANRESA et al, 1991 e ARINO et al, 1996). A preferência por essa fonte de nitrogênio pode estar relacionada ao fato de *P. aeruginosa* ser apta a fazer desnitrificação utilizando o nitrato como aceptor de elétrons (MANRESA et al, 1991). Fatores ambientais e condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio afetam a produção de biossurfactantes, interferindo no crescimento e na atividade celular (DESAI e BANAT, 1997).

A produção de ramnolipídios por *Pseudomonas* sp. É favorecida em pH entre 6,0 e 6,5, porém acima de 7,0, a produção caiu bruscamente (GUERRA-SANTOS et al, 1984). A temperatura ótima de produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* 44T1 foi 37°C, de acordo com Robert et al, (1989). A temperatura pode afetar também a composição do biossurfactante produzido por linhagens de *Pseudomonas* sp. DSM-2874 (SYLDATK et al, 1985a).

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

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

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

2.6.3 Melhoramento de linhagens

Os micro-organismos evoluíram para sobreviver sob condições naturais e não são propensos a exibirem alta produção e acúmulo de qualquer biomolécula, portanto, implementação de um processo de produção novo, econômica e ambientalmente competitivo, para qualquer produto, inclusive os ramnolipídios, exige o desenvolvimento de estratégias de engenharia que satisfaçam a demanda em termos de produtividade (KUHN et al 2010).

A compreensão limitada da fisiologia da regulação microbiana e a falta de modelos preditivos para as reações de biocatálise da célula como um todo são as principais razões para as baixas produtividades de produtos microbianos em geral (WOODLEY 2008). De acordo com Müller e Hausman., (2011) para aumentar o desenvolvimento do processo de produção de ramnolipídios, há necessidade de informações detalhadas sobre a regulação da produção de ramnolipídios durante cultivos em biorreator e assim, delinear estratégias baseadas na engenharia metabólica visando o aumento da produção de ramnolipídios.

A engenharia metabólica permite otimizar a produtividade e fatores de conversão de substrato aos produtos de interesse através da análise de fluxos metabólicos (AFM), que podem ser determinados com medidas de velocidades específicas de produção e consumo de metabólitos intra e extracelulares (STEPHANOPOULOS et al., 1998). A análise de fluxo metabólico pode ser feita também através de experimentos onde se emprega substratos rastreadores como o isótopo estável ^{13}C e os resultados obtidos permitem a elaboração de um mapa metabólico com um diagrama das principais reações

bioquímicas envolvidas e a estimativa das velocidades de cada passo em estado estacionário (GOMBERT e NIELSEN, 2000).

As etapas compreendidas pela engenharia metabólica são: (1) análise do metabolismo da linhagem em questão; (2) proposta de modificações genéticas que acarretem em melhor desempenho na biossíntese do produto de interesse e (3) construção da linhagem modificada, através da aplicação de técnicas da engenharia genética. A análise de fluxos metabólicos é uma importante ferramenta no desenvolvimento das duas primeiras etapas, pois permite o estabelecimento de fluxos em uma dada rede metabólica e a partir dos resultados obtidos propor mudanças genéticas que resultem em alteração dos fluxos e consequente aumento da produção do composto de interesse (NIELSEN et al., 2001).

A aplicação da engenharia metabólica no processo de produção de ramnolipídios pode fornecer informações sobre o fluxo de carbono nas rotas metabólicas utilizadas pela bactéria e a partir disso, estabelecer mudanças genéticas nas linhagens de *P. aeruginosa*, focando o aumento da produção do bioproduto, adotando uma estratégia estruturada na modelagem dos sistemas biológicos.

2.6.4 Produção em biorreatores

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

Linhardt et al (1989) relataram em seu trabalho, uma produção de 46 g/L de ramnolipídios. Os experimentos desenvolvidos por eles foram conduzidos, em batelada, e a fonte de carbono utilizada foi óleo de milho. Müller et al (2010) utilizaram

o sistema no modo de batelada e alcançou 38 g/L de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* PAO1. Trummler et al, (2003) conseguiram uma produção de 45 g/L operando o sistema em batelada alimentada, a fonte de carbono foi óleo de canola.

Alguns autores relatam um decréscimo na produção desses biotensoativos quando o cultivo ocorre no modo batelada alimentada. Lovaglio et al, (2010) obteve uma produção 16,9 g/L de ramnolipídios com cultivo em batelada, porém ao utilizar o sistema alimentado a produção caiu para 4g/L. Experimentos utilizando alimentação também apresentaram efeito negativo na produção de biossurfactantes por *Candida antarctica*, acarretando em uma redução de 45,5g/L para 28,0g/L (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000).

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

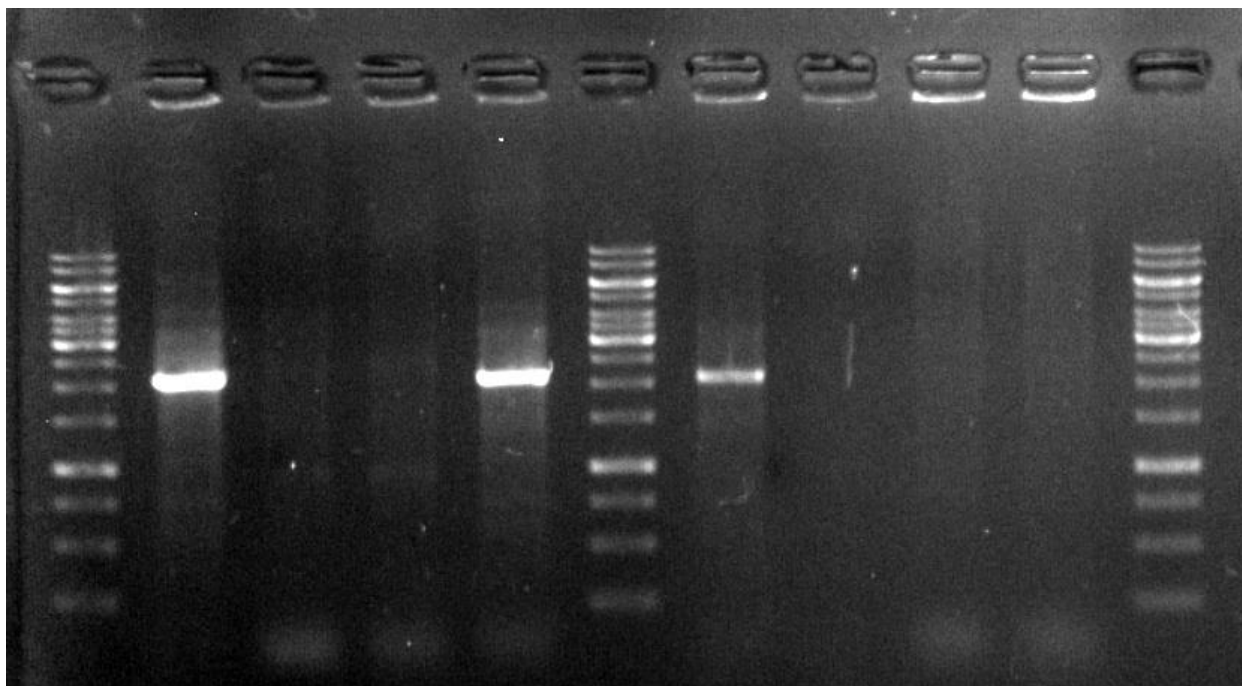
ZHU et al, (2012) utilizaram da cinética de fermentações acoplada a modelagem matemática em seus experimentos. A modelagem mostrou que a produção deveria continuar aumentando quando os dados experimentais não condiziam com o predito. Os autores decidiram empregar a alimentação para verificar se dessa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

Estes resultados comprovam que a alimentação pode ser uma estratégia empregada para aumentar a concentração final de ramnolipídios, tornando o processo

mais rentável, esse trabalho mostra a importância do uso da modelagem para uma maior compreensão dos processos fermentativos e consequentemente na produção dos biossurfactantes.

A revisão bibliográfica demonstra que apesar de todas as pesquisas desenvolvidas voltadas para a produção dos biossurfactantes, em especial dos ramnolipídios ainda existem lacunas de conhecimento acerca do metabolismo desses biotensioativos e que o uso de técnicas como a análise de fluxo de carbono pode ajudar a preencher essas lacunas, podendo possibilitar um aumento na produção desses biotensioativos, o que viabilizaria um aumento no uso desses metabolitos microbianos e consequentemente reduziria o uso dos surfactantes químicos reduzindo os impactos ambientais causados pelos mesmos.

**3 CAPÍTULO I I – CONSTRUÇÃO DAS CEPAS MUTANTES DE *P.*
aeruginosa.**



3.1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é a reconhecidamente o principal micro-organismo utilizado na produção de ramnolipídios (SANTOS et al., 2016), sendo ela uma bactéria Gram negativa extremamente versátil que pode estar presente em diversos nichos ecológicos como solo e ambientes marinhos. Tal bactéria pode metabolizar diversas fontes de carbono inclusive algumas não convencionais devido ao seu genoma complexo (FILLOUX; RAMOS, 2014).

O genoma da *P. aeruginosa* se aproxima em tamanho e complexidade ao genoma dos eucariotos mais basais, além disso, esse micro-organismo apresenta ainda uma grande plasticidade no genoma e uma ampla gama de reguladores, o que permite a essa espécie bacteriana a colonização novos ambientes (FRANK, 2012).

A maioria dos estudos de biologia molecular são realizados em *Escherichia coli*, o organismo procarionte modelo, porém com a evolução das técnicas de biologia molecular novos organismos estão surgindo como modelos interessantes a serem estudados e a *P. aeruginosa* é um deles, principalmente pela sua versatilidade metabólica, sendo esse o motivo de diversos protocolos de biologia molecular serem bem estabelecidos para essa bactéria (FILLOUX; RAMOS, 2014).

Ao longo dos anos essa espécie microbiana vem sendo utilizada como modelo em diversos estudos nas áreas de: biologia molecular, genética de procariontes, metabolismo e patogenicidade.

A *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 é apontada como a cepa modelo para a produção de ramnolipídios (MULER et al, 2010). Além disso a *P. aeruginosa* PAO1 possui o seu genoma completamente sequenciado e acessível, o que facilita estudos nas áreas de metabolismos e engenharia metabólica utilizando tal cepa, sendo esse o motivo de se

escolher essa linhagem como base para a construção e desenvolvimento das cepas mutantes a serem utilizadas no presente estudo.

3.2 OBJETIVO

- Realizar a construção das cepas mutantes:
 - *Pseudomonas. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG (linhagem selvagem com a deleção do gene *rhlG*)
 - *Pseudomonas. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlYZ (linhagem selvagem com deleção nos genes *rhlY* e *rhlZ* que se encontram em um pequeno operon)
 - *Pseudomonas. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG Δ rhlYZ (linhagem selvagem com a deleção do gene *rhlG* e dos genes *rhlYZ*).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Micro-organismo utilizado

A *P. aeruginosa* PAO1 é linhagem de *Pseudomonas* mais utilizada no mundo para pesquisa, ela é derivada da linhagem original australiana *P. aeruginosa* PAO. Após décadas de discordância acerca do fenótipo dessa bactéria as sub-linhagens de PAO1 surgiram, tomando a cepa PAO1-UW que possui o genoma sequenciado como referência (essa cepa recebeu o sufixo UW, pois o projeto de sequenciamento foi liderado pela universidade de Washington), foi possível separar as linhagens MPAO1 e PAO1-DSM, a sub-linhagem *P. aeruginosa* MPAO1 foi utilizada pela universidade de Washington para a construção de uma biblioteca de mutantes, construídos pela inserção de transposon (KLOCKGETHER et al., 2010).

Devido a essa sub-linhagem estar acessível e já possuir uma biblioteca de mutantes previamente construída escolheu-se trabalhar com ela. Dessa forma linhagem utilizada para a construção dos mutantes foi a *P. aeruginosa* MPAO1, oriunda do banco

de micro-organismos do Institute of Applied Microbiology – iAMB da RWTH Aachen university.

3.3.2 Procedimento de deleção dos genes de interesse

3.3.2.1 Extração e purificação do DNA genômico

Inicialmente, inoculou-se 100µL, da linhagem *P. aeruginosa* MPAO1 que estava congelada a -80°C, em um tubo de ensaio estéril contendo 5ml de caldo Lisogênico (LB). O material foi mantido a 37°C e 200 RPM por 12 horas.

Após o período de incubação, utilizou-se o kit high pure PCR template preparation kit da Roche, para realizar a extração do DNA genômico da bactéria.

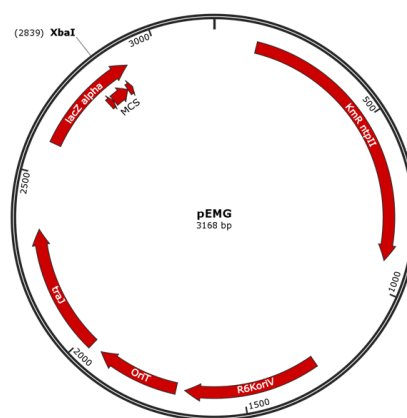
O DNA extraído foi então purificado utilizando o kit high pure PCR product purification kit da Roche, após a purificação o DNA foi quantificado utilizando NanoDrop™ One/OneC da Thermo Fisher scientific.

3.3.2.2 Construção do plasmídio pMEG contendo as regiões adjacentes aos genes de interesse

Para construir o plasmídio contendo as regiões adjacentes aos genes alvos, realizou-se inicialmente a digestão do plasmidio pEMG (Martinez-Garcia e de Lorenzo, 2011), que se encontrava na biblioteca de plasmídios do Institute of Applied Microbiology – iAMB da RWTH Aachen university. O plasmídios foi extraído utilizando o Monarch® Plasmid Miniprep Kit da NEB e posteriormente purificado utilizando o kit Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit. Após isso o plasmídio foi digerido utilizando a enzima de digestão *XbaI*, a 37°C “overnight”. Após a digestão tratou-se o material com uma fosfatase, para evitar a recircularização do plasmídio. A Figura 2 mostra um esquema do plasmídios antes e depois da digestão.

Figura 2: Desenho esquemático do plasmídios pMEG (A) antes e (B) após a digestão pela enzima XBAI.

A)



B)



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.3.2.2.1 Amplificação das regiões adjacentes aos genes de interesse

Após a realização da extração do DNA genômico da bactéria *P. aeruginosa* MPAO1, foi necessário amplificar as regiões adjacentes aos genes de interesse, a fim de construir o plasmídeo que vai auxiliar na deleção do gene alvo.

Tais regiões foram denominadas TS1 e TS2 de cada gene. A fim de amplificar tais regiões utilizou-se a ferramenta NEBuilder Assembly Tool v1.12.15 fornecida pela New England Biolab disponível no site www.neb.com; essa ferramenta ajudou a desenhar os primers a serem utilizados na amplificação das regiões TS de ambos os genes e na construção do vetor utilizado para a deleção dos genes alvos.

Os primers utilizados para a amplificação das regiões TS1 e TS2 do gene *rhlG* foram:

Tabela 1: Tabela dos primers utilizados para amplificação da região TS1 e TS2 do gene *rhlG*.

Primers	Descrição
AGCTCGGTACCCGGGGATCCGTAGTGCCAATGCACGTCGAGG	Forwad - TS1
AGTCATTCCCGCGCCGCCAATCCGGGTA	Reverse- TS1
TTGGCGGCGCGGGAATGACTCCGGGCTG	Forward- TS2
TTGCATGCCTGCAGGTCGACCAGCGTTTCCGCCAGCTG	Reverse- TS2

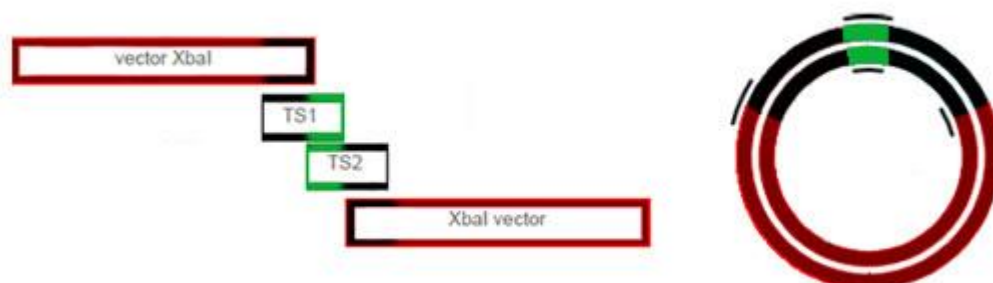
Já para a amplificação das regiões TS1 e TS2 dos genes *rhlYZ* foram utilizados os seguintes primers:

Tabela 2: Tabela dos primers utilizados para amplificação da região TS1 e TS2 dos genes *rhlYZ*.

Primers	Descrição
GCTCGGTACCCGGGGATCCTGGAGCGTTCTCCATCACCCCCGGC	Forwad – TS2
GAGGGACTTCTCCGCGCGCGCCGCTCT	Reverse- TS2
GCGCGGCGGAGAAGTCCCTCACTGGATCATG	Reverse- TS1
TGCATGCCTGCAGGTCGACTGGCGACGAATACGTGCTG	Forward- TS1

As regiões em vermelho são responsáveis por se ligar ao backbone do plasmídeo pMEG a ser utilizado após o mesmo ser digerido utilizando a enzima *XbaI*, as regiões em verde foram responsáveis por fazer o overlapping das regiões TS1 e TS2 durante a reação de Gibson e as regiões em preto se alinham com o a região TS para amplifica-la como é como demonstrado na Figura 3.

Figura 3: Figura representando as ligações das regiões TS1 e TS2 no backbone do plamídio digerido com a enzima XBAI



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

As regiões TS dos genes foram então amplificadas pela técnica de PCR.

3.3.2.3 Reação de Gibson

Após a amplificação das regiões TS1 e TS2 adjacentes aos genes de interesse e a digestão do plasmídios pMEG realizou-se uma reação de Gibson utilizando o Gibson Assembly Cloning Kit, para a ligação do backbone do plasmídeo as regiões TS, a correta formação do plasmidio foi então confirmada através de uma reação de PCR e posterior visualização do produto da mesma em gel.

3.3.2.4 Inserção dos plasmídios na bactéria e incorporação no DNA genômico utilizando o mating triparental

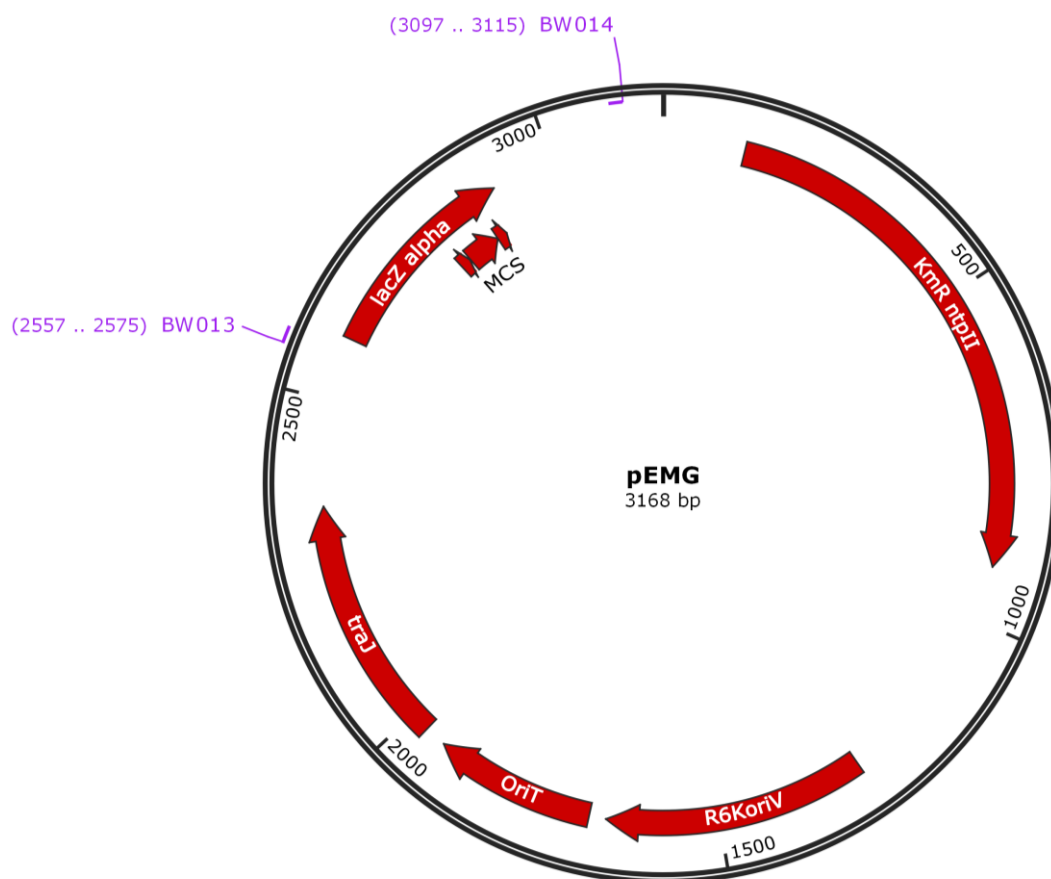
O plasmídeo pMEG contendo as regiões TS1 e TS2 do gene *rhlG* e dos genes *rhlYZ* foram posteriormente inseridos em diferentes células competentes de *E. coli*, a transformação se deu da seguinte maneira:

100 μ L de uma solução de células competentes de *E. coli* DH5 α λ pirII foram adicionadas a um eppendorf de 2ml e mantidas em gelo, adicionou-se então 5 μ L do produto de uma das reações de Gibson as células competentes (plasmídios contendo as

regiões TS do gene *rhlG* ou do plasmídio contendo as regiões adjacentes dos genes *rhlYZ*) , esse material foi agitado 5 vezes pipetando para cima e para baixo (agitando levemente para não causar lise celular), a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, após isso o material foi submetido a um choque térmico sendo colocado a 42°C por 90s. Adicionou-se então a solução 300µL do meio de cultura SOC, o material foi então incubado a 37°C, 250 rpm por 60 minutos, as células foram re-suspensas e duas amostras de 100 µL foram inoculados em 2 placas contendo LB ágar e canamicina na concentração de 50µg.ml⁻¹ (o suficiente para inibir o crescimento da *E. coli* sem o plasmídios contendo o marcador de resistência), as placas foram incubadas “over night” a 37 °C.

24 clones de cada placa foram selecionados e transferidos para uma nova placa de LB ágar com canamicina na concentração de 50µg.ml⁻¹ esses clones foram então submetidos a um PCR de colônia utilizando os primers (BW013 - TTTGCACTGCCGGTAGAAC e BW014 - AATACGCAAACCGCCTCTC) os quais se ligam à regiões específicas do plasmidio pEMG como é possível visualizar na Figura 4:

Figura 4: Esquema do plasmídeos pEMG mostrando a localização dos primers BW013 e BW014.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tais primers foram utilizados com a finalidade de amplificar as regiões TS1 e TS2 inseridas nos plasmídios, o que indicaria a construção correta do mesmo. Realizou-se posteriormente a corrida de um gel permitindo assim estimar o tamanho do fragmento amplificado permitindo assim inferir sobre a presença ou não dos fragmentos de interesse nos clones selecionados. Dentre os clones que apresentaram os fragmentos desejados escolheu-se um deles para a extração e sequenciamento do plasmídeo, a fim de confirmar sua construção.

Confirmada a presença dos plasmídios nos clones da *E. coli* DH5 α λ pirII tais cepas foram armazenadas no banco de micro-organismos da universidade.

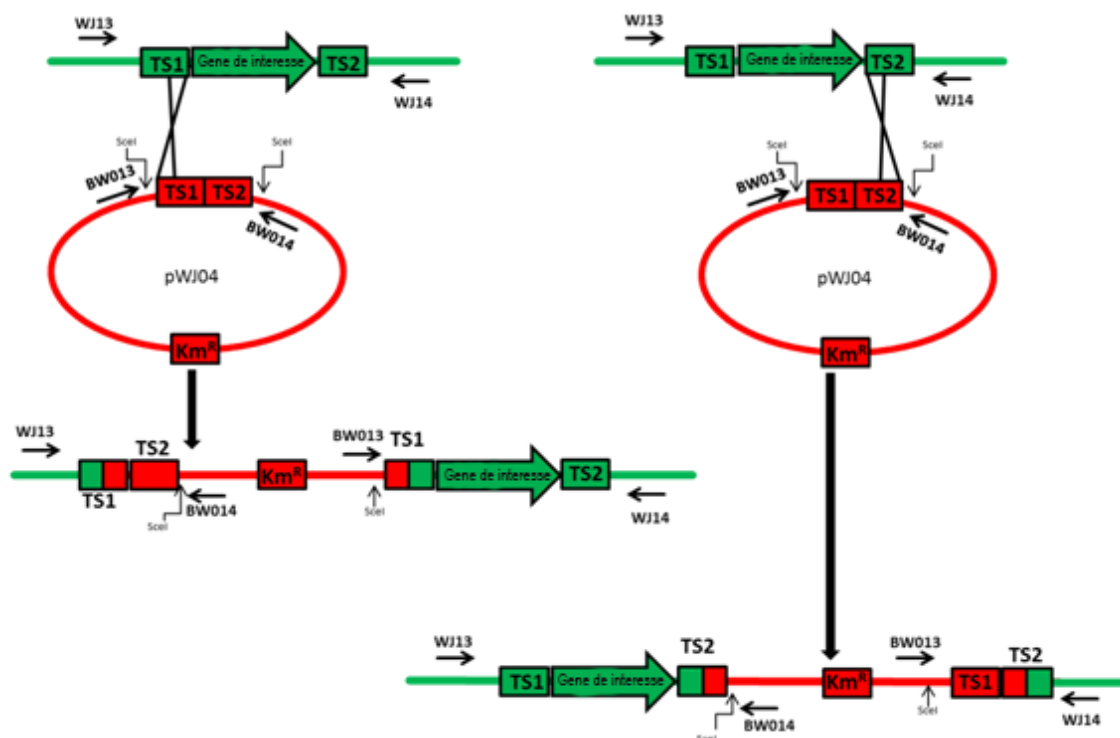
Posteriormente, realizou-se o mating triparental para transferir o plasmídios pMEG contendo as regiões TS1 e TS2 para a bactéria *P. aeruginosa* MPAO1.

O mating foi realizado em placa contendo Agar LB sem presença de antibióticos, nessa placa numa área de aproximadamente 1cm² estriou-se a *P. aeruginosa* MPAO1 e sobre a mesma a *E. coli* DH5α λpirII contendo os plasmídios pMEG TS1 e Ts2 de um dos genes alvos e a *E. coli* HB101 pRK2013 (helper), que serve para ajudar na transferência do plasmídio para a bactéria alvo, sendo o material então incubado a 37°C por 8 horas.

Após o período de incubação, foram retiradas duas alçadas do material que cresceu na placa, as células foram diluídas em 500µL de solução salina estéril em um microtubo de 2mL, o material foi agitado para a formação de uma solução homogênea, 100µL da suspensão celular foi então plaqueada pela técnica de espelhamento de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultura cetrimide Agar com 500µg/mL de canamicina.

As placas foram incubadas a 37°C por 24h. O meio cetrimide Agar é seletivo para *Pseudomonas*, portanto, nas placas deveriam crescer apenas mutantes de *P. aeruginosa* contendo o plasmídio de resistência a canamicina. A fim de confirmar se os clones continham realmente o plasmídio desejado foram selecionados 24 clones do cetrimide Agar contendo canamicina para realizar uma reação de PCR utilizando os primers, um dos plasmídios (BW013 ou BW014) e um do genoma (forward utilizado para amplificar a região TS1 ou reverse da TS2). O produto do PCR foi visualizado em gel permitindo confirmar a presença do plasmídio, além de mapear a forma como o mesmo se inseriu no genoma da bactéria por recombinação homologa. Esse mapeamento pode ser verificado de acordo com o tamanho do fragmento apresentado como mostrado na Figura 5:

Figura 5: Esquema do mapeamento da inserção do plasmídio no genoma bacteriano (os primers wj13 e wj14 são variáveis para cada fragmento de interesse, uma vez que são os primer usados para amplificar as regiões TS de interesse).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

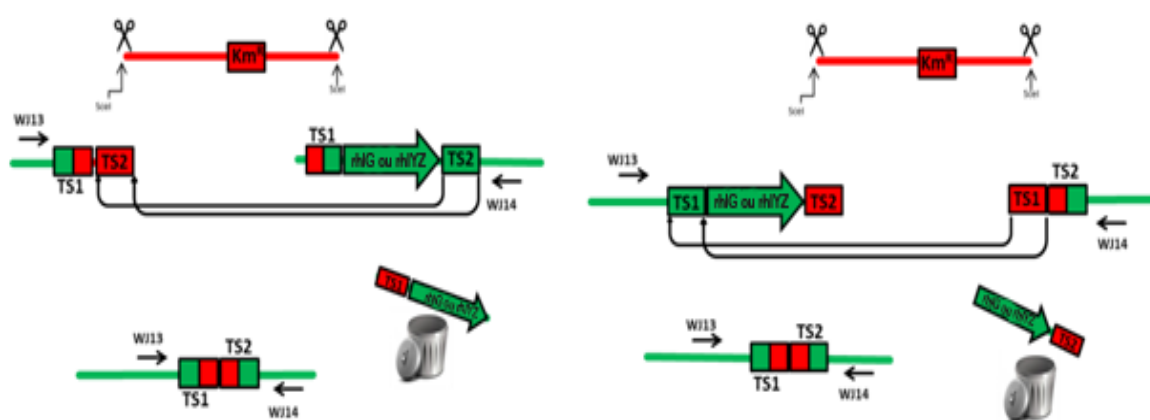
3.3.2.5 Inserção do plasmídios PSW2

Para que ocorra a deleção do gene ou genes de interesse é necessário inserir no mutante *P. aeruginosa* MPAO1 pMEG+TS1+TS2 o plasmídio PSW-2, Que contém um marcador de resistência a gentamicina e o gene que codifica a enzima de restrição *SceI*, essa enzima será responsável pela clivagem de duas região específicas do plasmídio, anterior ao fragmento TS1 e posterior ao TS2, como pode-se verificar na figura 5.

A inserção do plasmídios PSW-2 foi realizada também por mating triparental, sendo que para isso vez utilizou-se a cepa contendo o plasmídio desejado (pSW-2), a linhagem de *E. coli* helper e a *Pseudomonas* com o plasmídios pMEG e as regiões TS inseridas no genoma.

O reparo do material genômico pode gerar em uma cepa com deleção ou retornar a cepa a condição selvagem na proporção de 50% , a Figura 6 apresenta um desenho esquemático de como ocorre a deleção.

Figura 6: Esquema explicando como ocorre a deleção após a clivagem do DNA genômico ser promovida pela enzima de restrição SclI produzida devido a inserção do plasmídeo PSW-2.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Após o mating triparental entre a *P. aeruginosa* MPAO1 contendo o plasmídeo pMEG+TS1+TS2 de um dos genes de interesse, a *E. coli* HB101 pRK2013 (helper) e a *E. coli* PSW-2, foi realizado um screening em placas contendo LB Agar e gentamicina na concentração de 50µg/ml.

A fim de reduzir a ocorrência de falsos positivos os mesmos clones foram inoculados em LB Agar contendo 500µg/ml canamicina. Os clones que cresceram em gentamicina e não em canamicina foram selecionados para a realização de um PCR de colônia possibilitando assim verificar se a deleção do gene alvo realmente ocorreu.

3.3.2.6 Remoção do plasmídios PSW2

Confirmada a deleção utilizando a reação de PCR procedeu-se com a retirada do plasmídios PSW-2 dos clones, pois dessa maneira teríamos o mutante sem nenhum marcador de resistência. Para isso as cepas foram repicadas em meio LB de 8 em 8h por 3 dias, após esse repique continuo realizou-se um plaqueamento de superfície e selecionou-se 50 clones. Esses clones foram plaqueados em meio LB Agar e em LB Agar com gentamicina. Os clones que cresceram apenas no LB Agar foram selecionados.

Para a cepa com a dupla deleção o procedimento de deleção foi realizado duas vezes uma para a deleção do gene *rhlG* e sequencialmente para a deleção do gene *rhlYZ*, isso só foi possível, pois ao final da deleção a cepa não possui nenhum marcador de resistência a antibióticos.

3.3.2.7 Softwares utilizados

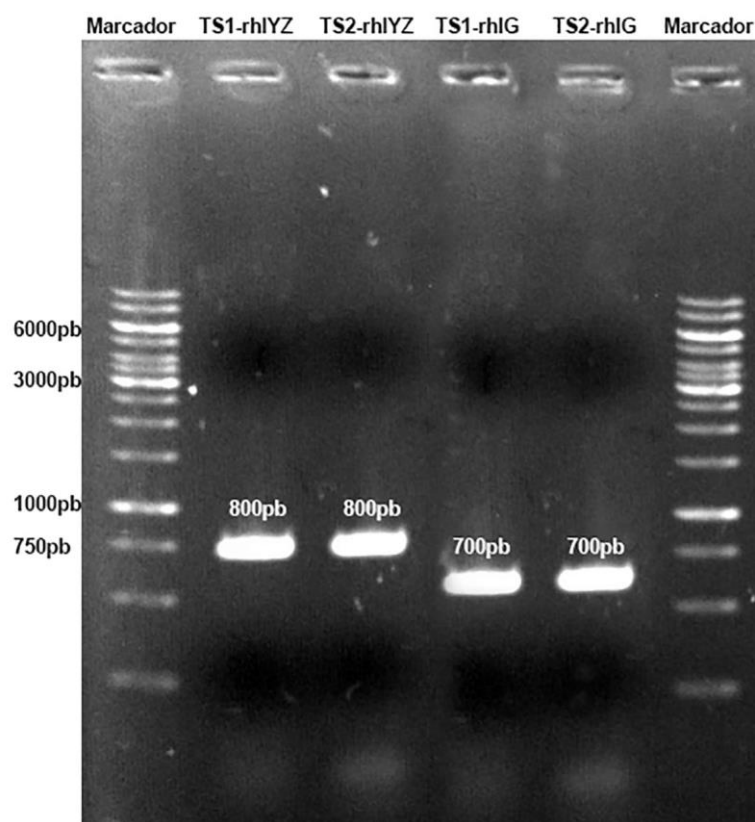
Para o desenho das moléculas e representações esquemáticas foram utilizados os softwares snapgene e clone manager 9.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do DNA genômico resultou em uma concentração de $381,9 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ a razão entre a absorbância a 260/280 nm foi de 1,92, estando dentro da faixa ótima que varia de 1,8 a 2,0 e a razão da absorbância 260/230 nm foi de 2,12 também dentro da faixa ótima que varia de 2,0 a 2,2. Após verificar que a extração do DNA genômico foi bem sucedida realizou-se então a amplificação das regiões TS1 e TS2 do gene *rhlG* e dos genes *rhlYZ*, após a amplificação das regiões TS de interesse realizou-se um gel do produto de PCR das mesmas (

Figura 7).

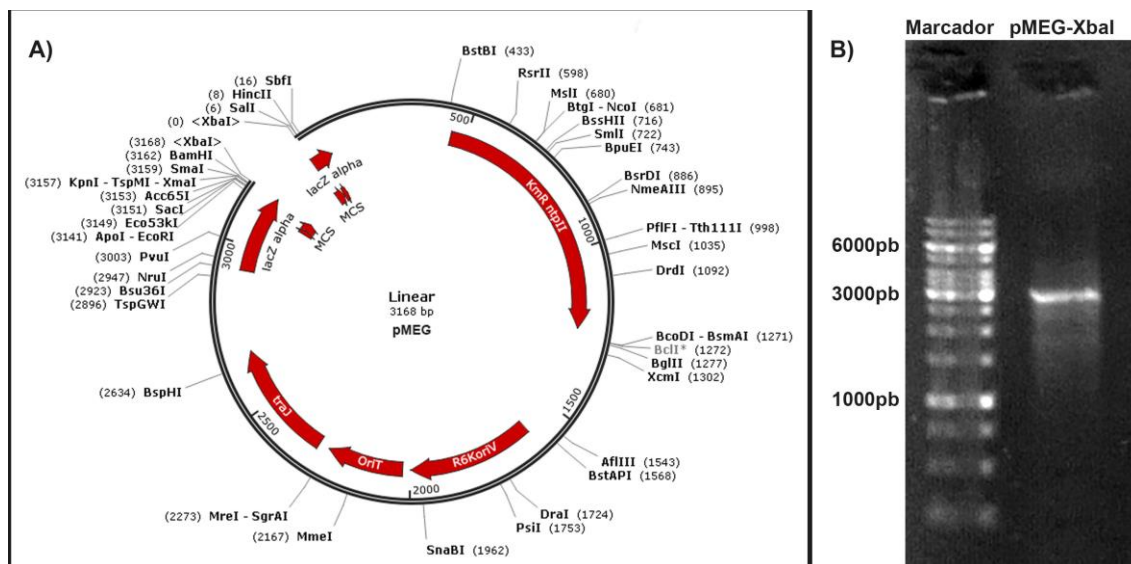
Figura 7: Gel das regiões TS1 e TS2 do operon *rhLYZ* e do gene *rhIG*



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

O PCR das regiões TS nos permite verificar que as mesmas foram amplificadas com sucesso e apresentam o tamanho esperado. Confirmada a amplificação das regiões TS procedeu-se então com a digestão do plasmídios pMEG utilizando a enzima *XbaI* Figura 8.

Figura 8: (A) esquema do plasmídios pMEG digerido (B) Gel do plasmídios digerido.

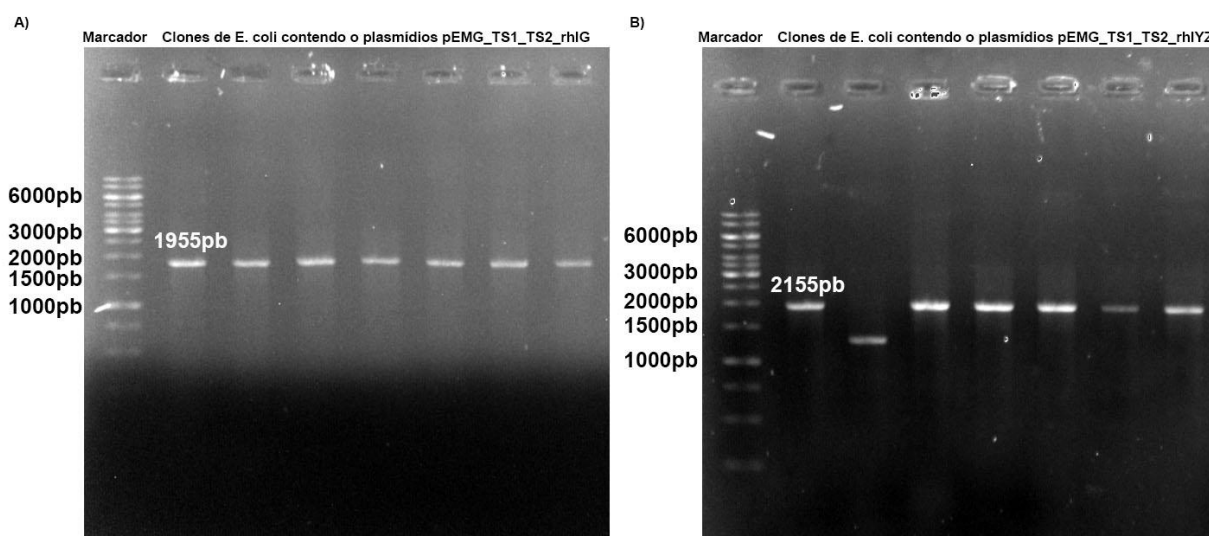


Fonte: elaborada pelo próprio autor.

O gel mostra que a digestão do plasmídios pMEG foi bem sucedida, pois se o mesmo ainda estivesse na forma circular, durante a corrida do gel a banda referente ao plasmidíio não se localizaria próximo a região de 3000 pares de bases (fig. 8B), pois na forma circular sua interação com o gel seria diferente, não se apresentando assim na posição correspondente ao seu tamanho como foi o observado.

Dessa maneira pode-se inferir que tanto a amplificação das regiões TS como a digestão do plasmídio pMEG foram bem sucedidas. Na etapa subsequente foram realizadas as reações de Gibson para a construção dos plasmídios pMEG contendo as regiões TS1 e TS2 do gene *rhIG* (pMEG_TS1_TS2-*rhIG*) e do plasmídio pMEG contendo as regiões TS do operon *rhIYZ* (pMEG_TS1_TS2-*rhIYZ*) a figura abaixo ilustra os plasmídios após a reação de Gibson (Figura 9).

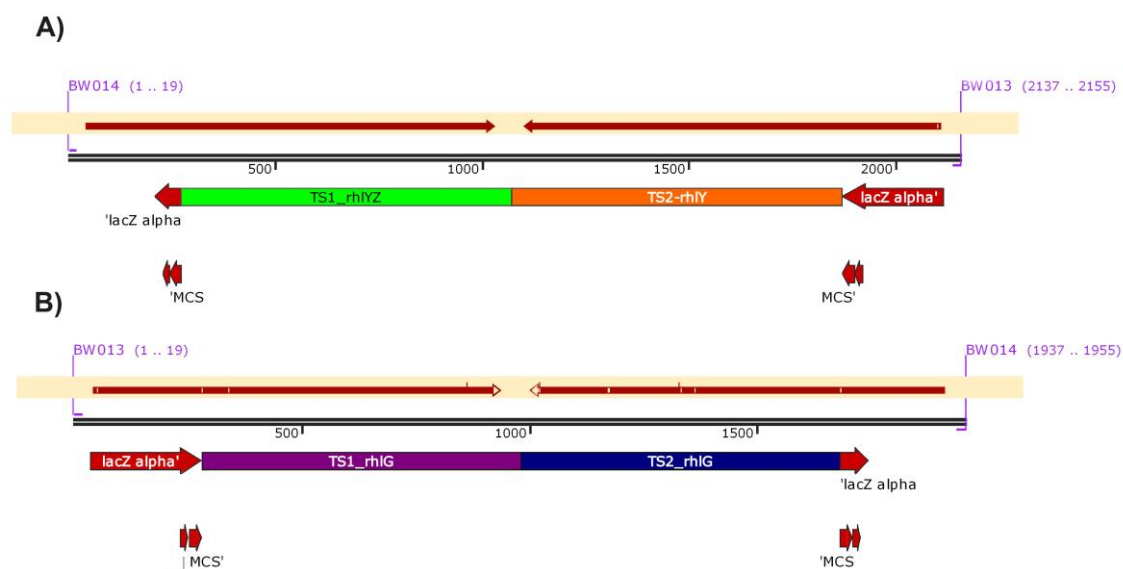
Figura 10: PCR de colônia dos clones de *E.coli* (A) contendo o plasmídio pMEG e as regiões TS do gene *rhlG* (B) contendo o plasmídios pMEG com as regiões TS do operon *rhlYZ*.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Dentre os clones que apresentaram um fragmento amplificado próximo ao esperado (1955 pb para os clones contendo o plasmídio com as regiões TS do gene *rhlG* e 2155pb para os clones contendo as regiões adjacentes aos genes *rhlYZ*), um clone de cada foi inoculado em meio LB contendo canamicina por 12h, posteriormente o DNA plasmidial foi extraído e sequenciado, para a comprovação da correta construção do plasmídio, os mapas dos alinhamentos entre o DNA extraído e as sequencias bases elaborado no SnapGen podem ser visualizados na Figura 11.

Figura 11: Mapas dos alinhamentos entre o DNA extraído e as sequencias bases elaborado no SnapGen (A) Mapa referente ao plasmídio contendo as regiões TS dos genes *rhIYZ* (B) mapa referente ao plasmídio com as regiões adjacentes do gene *rhIG*.



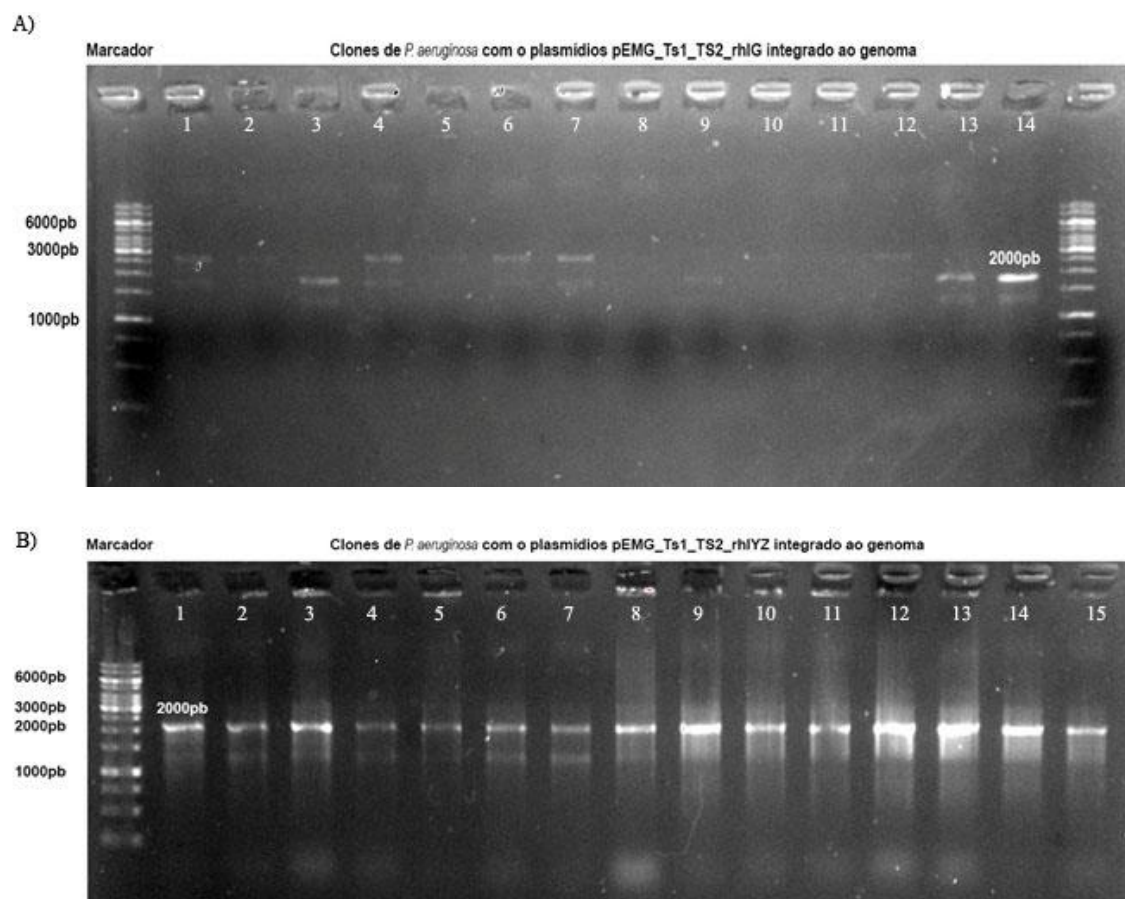
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como pode-se observar na Figura 11 o sequenciamento comprovou a correta inserção das regiões TS dos genes de interesse nos plasmídios, mesmo não sendo possível o sequenciamento completo do fragmento alvo, fica evidente o sucesso da reação de Gibson.

Após isso, foi realizado o mating triparental, com a finalidade de transferir o plasmidio para a *P. aeruginosa* MPAO1, posteriormente, fez-se o screening dos clones de *P. aeruginosa*, em cetrimide Agar contendo canamicina ($500 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), realizou-se então uma PCR dos clones selecionados a fim de confirmar a maneira como o plasmídios foi inserido no genoma bacteriano (

Figura 12).

Figura 12: Confirmação da inserção do plasmídio no genoma bacteriano. (A) Clones contendo o plasmídio pEMG e as regiões TS1 e 2 do gene *rhIG*. (B) Clones contendo o plasmídio e as regiões adjacentes aos genes *rhIYZ*.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A

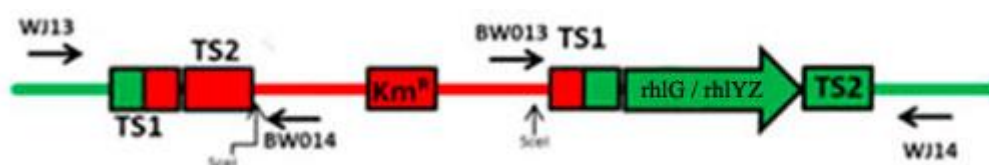
Figura 12 (A) nos permite observar que os fragmento maiores não foram amplificados, provavelmente devido ao tempo utilizado na reação de PCR ter sido muito curto para possibilitar a amplificação do fragmento grande ou as inserções nessa orientação não ocorreram. Pode-se observar ainda uma sombra de uma outra banda

amplificada, o que pode significar um anelamento dos primer não muito específico, provavelmente devido a temperatura de anelamento utilizada não ser a mais adequada.

Porém, ainda assim pode-se observar a amplificação de um fragmento bastante forte, no penúltimo pocinho do gel (14) ao lado do marcador. Tal fragmento apresenta um tamanho próximo a 2000pb, o que corresponde ao tamanho esperado das regiões TS1 e TS2 do gene *rhlG* (2155pb).

Os primers utilizados nessa reação de PCR foram BW014 e WJ13_rhlG (AGCTCGGTACCCGGGGATCCGTAGTGCCAATGCACGTCGAGG) foi possível observar a inserção do plasmídeo no genoma, na orientação esquematizada na Figura 13.

Figura 13: Forma de inserção que apresenta os fragmentos menores quando utilizados os primers wj13_rhlG e BW013 resultando em um fragmento de 2155pb.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Dentre os clones submetido a reação de PCR escolheu-se o clone número 14 para dar andamento aos trabalhos, por apresentar a banda mais forte.

Já a fig 12 (B) mostrou que para a inserção do plasmídeo pEMG_TS1_TS2_rhlYZ todos os clones avaliados apresentaram a orientação que gera o menor fragmento como apresentado na figura 13. Vale ressaltar que os clones de 1 a 7 eram clones da cepa *P*.

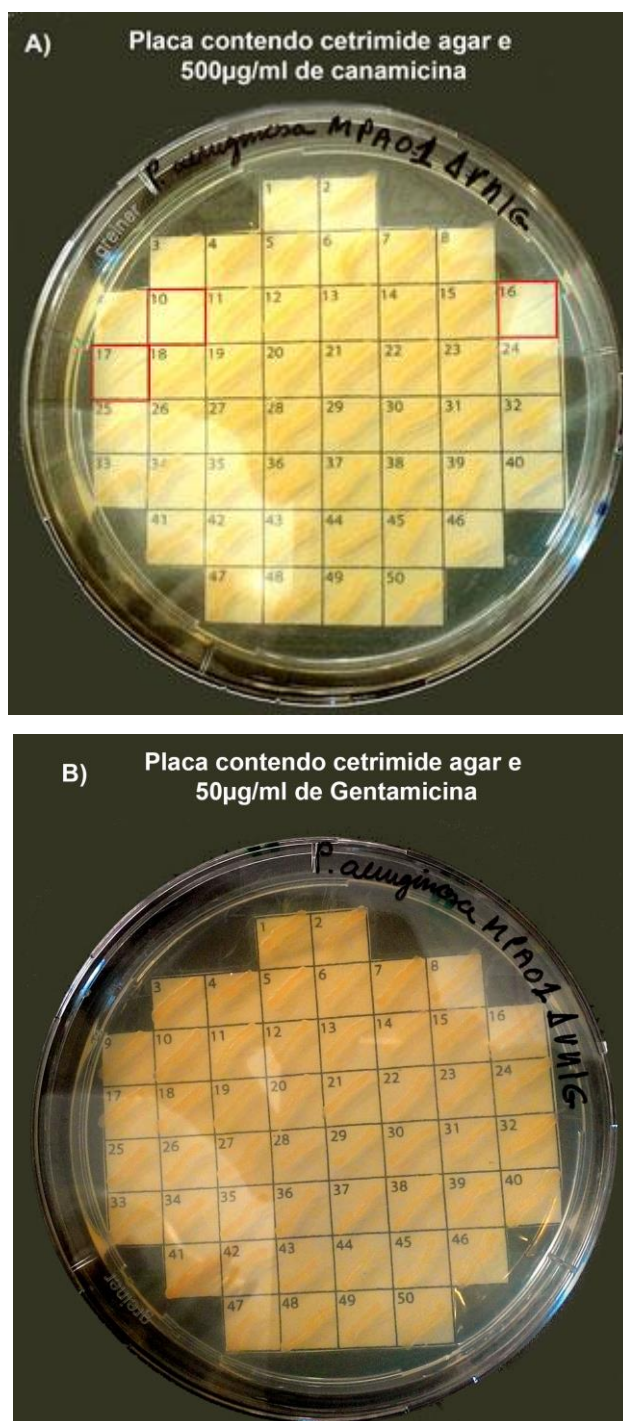
aeruginosa MPAO1 já os clones de 8 a 15 eram clones do mutante *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhIG, que já haviam passado pela deleção do gene *rhIG*.

Prosseguiu-se então com o clone número 1 da cepa *P. aeruginosa* MPAO1 e 14 da cepa mutante Δ rhIG.

Foram realizados então os matings das cepas contendo os plasmídios inserido no genoma e a *E.coli* PSW-2 (que contém o plasmídios PSW-2 com marcador de resistência para gentamicina e codifica a enzima *SceI*), pois a inserção desse plasmídios no genoma bacteriano leva a produção da enzima *SceI* que promove a clivagem do DNA genômico na região em que o plasmídio pMEG foi inserido, promovendo assim a deleção dos genes alvos, como apresentado no esquema da figura 6.

Após o pareamento, foi realizado o screening em placas contendo cetrímide Agar e gentamicina. Para evitar falso positivo, os mesmos clones foram colocados também para crescer em placas de cetrímide Agar e Canamicina. Como exemplificado na Figura 14. Pode-se observar que alguns clones não cresceram em canamicina porém continuaram crescendo nas placas contendo gentamicina, o que é um indicativo que o marcador de resistência para canamicina foi removido, indicando assim a possível deleção dos genes alvos (Pode-se observar no caso da figura 14 que os clones 16, 10 e 17(marcados em vermelho) não cresceram em canamicina apenas em gentamicina).

Figura 14: figura exemplificando o sceening dos clones de *P. aeruginosa* após a inserção do plasmídio PSW-2 e a deleção do gene de interesse.



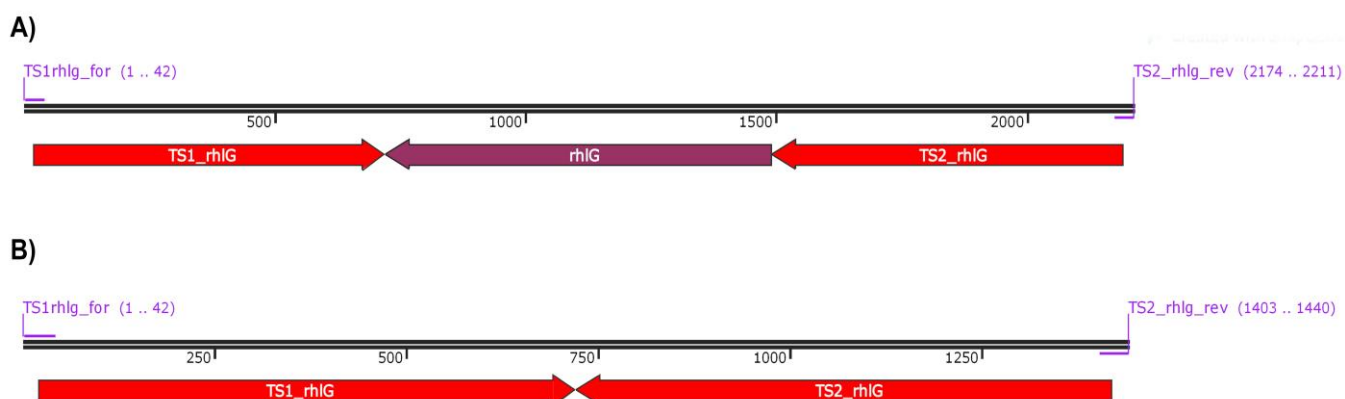
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os clones que apresentaram crescimento apenas em gentamicina foram submetidos a uma reação de PCR, utilizando os primers TS1_rhlG_f AGCTCGGTACCCGGGGATCCGTAGTGCCAATGCACGTCGAGG e TS2_rhlG_r

TTGCATGCCTGCAGGTCGACCAGCGTTTCCGCCAGCTG, que amplificariam na linhagem selvagem as duas regiões TS mais o gene rhlG como demonstrado na

Figura 15.

Figura 15: Esquema demonstrando as regiões a serem amplificadas na linhagem selvagem e na linhagem com a deleção do gene rhlG.

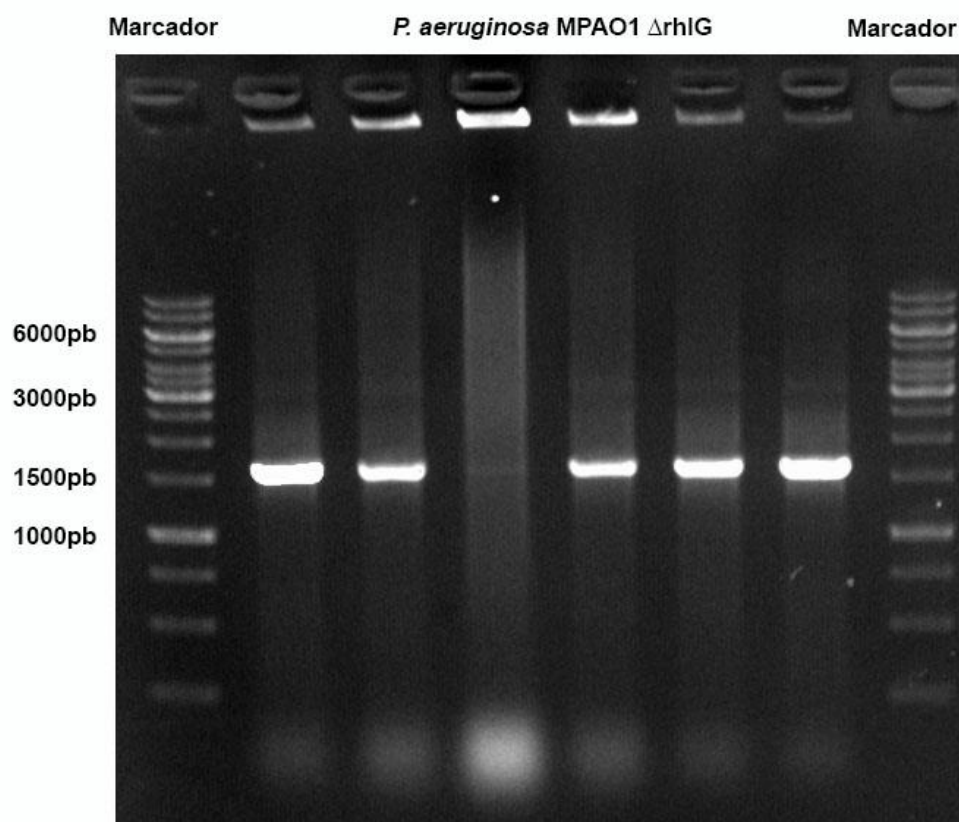


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O fragmento apresentado na figura 15 A possui 2211pb já o fragmento contendo apenas as regiões TS (fig. 15B) possui apenas 1440pb, realizou-se então a visualização do produto da reação de PCR em gel para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados, podendo assim constatar a deleção dos genes de interesse

Figura 16.

Figura 16: Gel demonstrando o resultado final da reação de PCR das regiões onde deveria estar o gene de *rhlG*, para verificar o sucesso da deleção do gene *rhlG*..



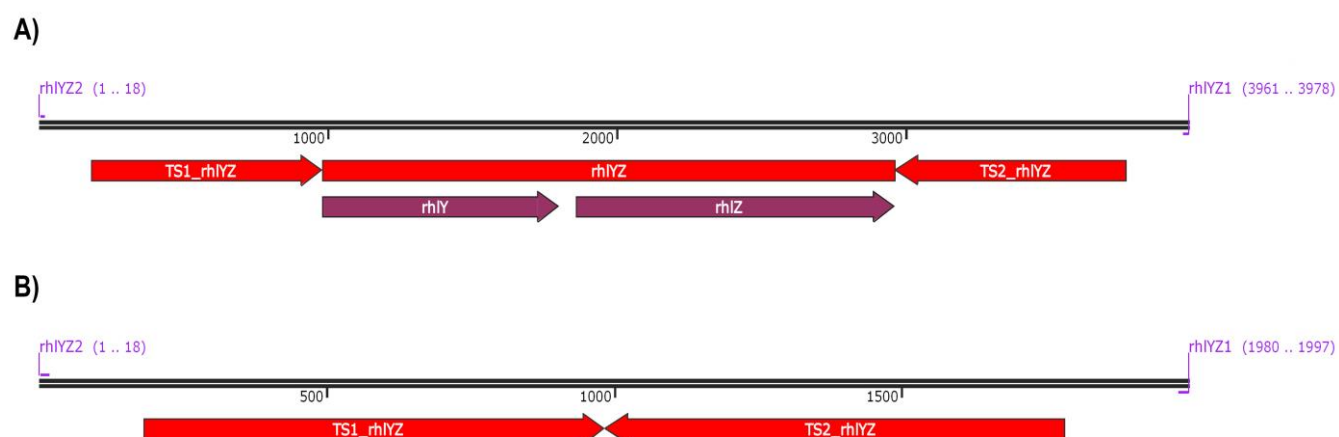
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A figura 17, nos permite verificar que a deleção do gene *rhlG* foi realizada com sucesso uma vez que o DNA amplificado tem por volta de 1500pb próximo ao esperado para a cepa contendo apenas as regiões TS1e TS2 do gene *rhlG* mas não o gene. O clone cujo produto do PCR foi visualizado no segundo pocinho foi escolhido como a cepa para dar seguimento aos trabalhos.

A verificação da deleção dos genes *rhlYZ* foi realizada utilizando os primers *rhlYZ1* GCCTGTCTATTGGCCTTG e *rhlYZ2* ACTACCGCCTACATCAGC, a reação de PCR utilizando esses primer na linhagem selvagem deveria resultar num fragmento de

3978pb como observado na figura 17A, porém quando a deleção é bem sucedida o fragmento amplificado deve possuir apenas 1997pb (fig 17B).

Figura 17: Esquema demonstrando as regiões a serem amplificadas na linhagem selvagem e na linhagem com a deleção dos genes *rhIYZ*.

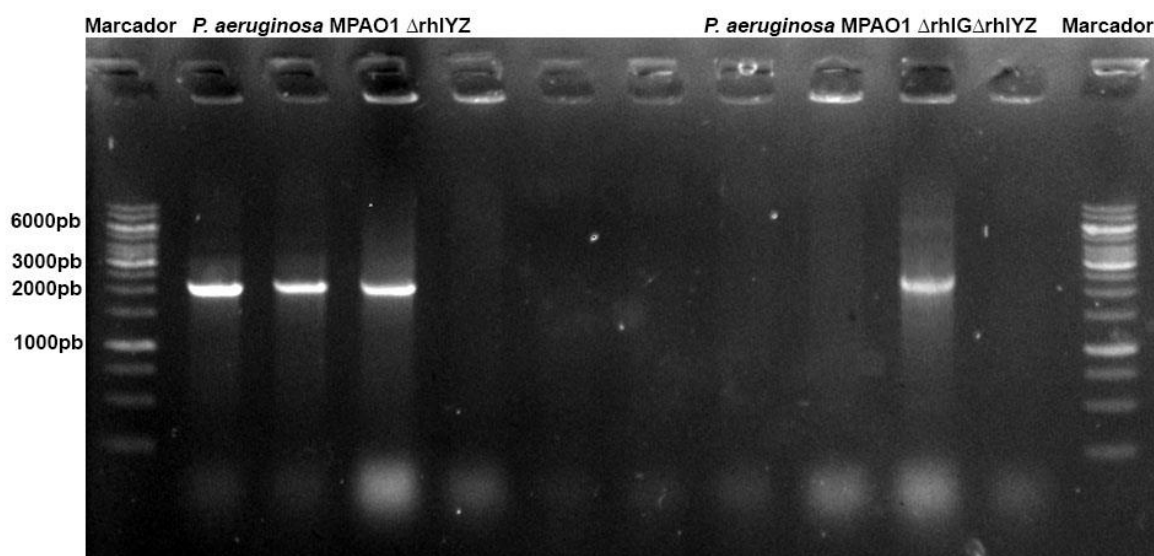


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A figura 18 apresenta a amplificação da região alvo tanto nos clones da cepa *P. aeruginosa* Δ *rhIYZ*, como nos clones submetido a duas deleções. Observa-se que em ambos os casos a deleção dos genes *rhIYZ* foi bem sucedida, porém para os clones com

deleção dupla apenas um dos que passaram pelo screening em placas contendo canamicina e gentamicina apresentou uma real deleção.

Figura 18: Gel demonstrando o resultado final da reação de PCR das regiões onde deveria estar o operon *rhIYZ*, para verificar o sucesso da deleção do operon *rhIYZ*.



Fonte:Elaborado pelo próprio autor.

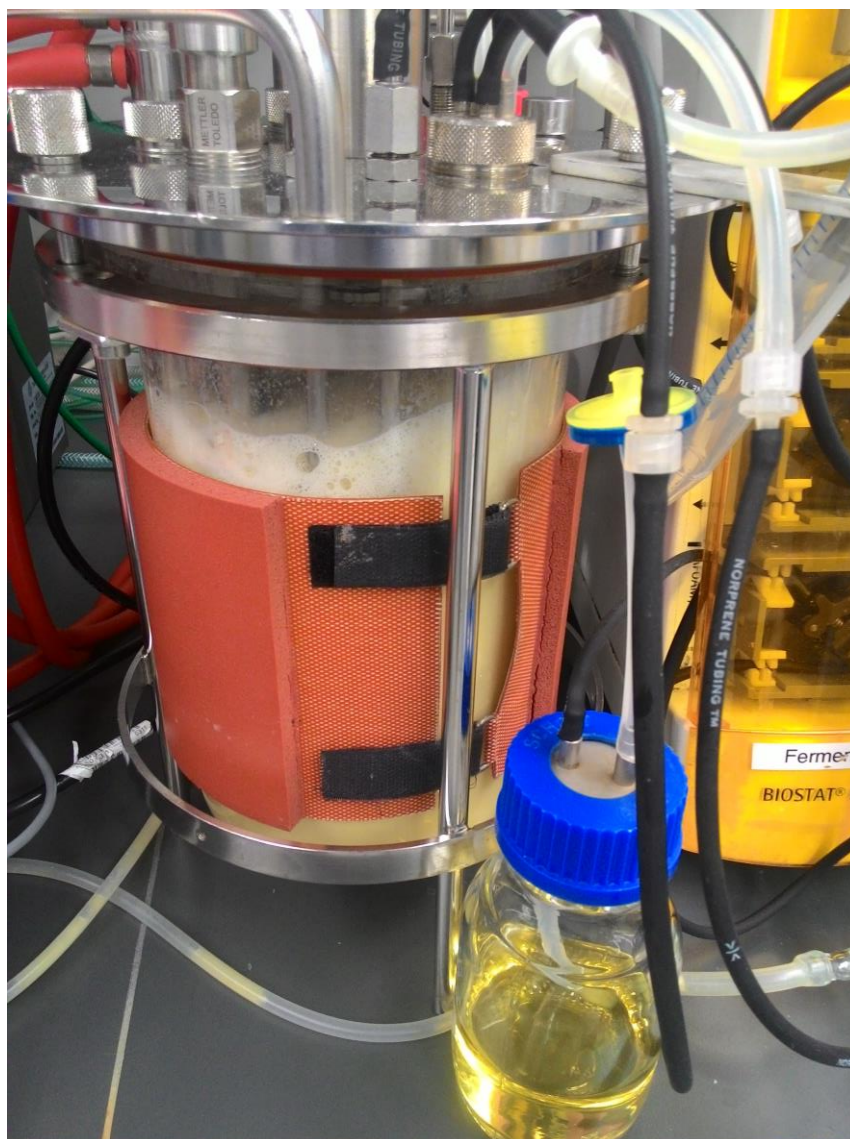
Após a confirmação das deleções, os clones foram submetidos a repiques sucessivos em meio líquido LB sem a presença de antibióticos para estimular a perda do plasmídios PSW-2; após a confirmação da perda do plasmídio, foram armazenados um clone de cada uma das cepas construídas no banco de micro-organismos do Institute of Applied Microbiology – iAMB da RWTH Aachen university e no LMI (Laboratório de

Microbiologia Industrial) da UNESP de Rio claro, em ambos os bancos as cepas estão armazenadas a -80 °C.

3.5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as cepas foram construídas com sucesso e que as técnicas empregadas foram eficientes na deleção do gene *rhlG* e do operon *rhlYZ*, podendo assim dar prosseguimento ao trabalho analisando as características apresentadas pelas novas linhagens quando submetidas a fermentações.

4 CAPITULO III - ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR *P. AERUGINOSA*.”



4.1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas, que devido à presença de regiões com polaridades distintas apresentam propriedades como a capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial (MULLIGAN, 2005). O consumo de surfactantes em 2016 foi responsável pela movimentação de 31 bilhões de dólares (Ceresana, 2018). O que torna o mercado dos surfactantes bastante atrativo.

A maioria dos surfactantes sintéticos é derivado do petróleo, contudo na natureza são encontrados compostos com as mesmas propriedades, os quais são denominados biossurfactantes. Os micro-organismos são os principais produtores dessas biomoléculas (BANAT et al, 2000).

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

Apesar dessas vantagens os biossurfactantes não são utilizados em larga escala, isso se deve principalmente ao alto custo de produção, que está atrelado ao custo do substrato utilizado, baixa produtividade e dificuldade na recuperação do bioproduto (MÜLLER et al, 2010).

Os ramnolipídios estão entre os biotensoativos mais bem estudados, devido ao fato dessas moléculas serem ambientalmente compatíveis e robustas o bastante para aplicações industriais (MARCHANT ; BANAT, 2012). Apesar do interesse nos ramnolipídios e de todas as pesquisas empenhadas em otimizar a produção desse

bioproduto, rendimentos mais elevados ainda são necessários para a produção industrial economicamente viável abdel-mawgoud et al, (2014).

Para elevar os rendimentos desse bioproduto é necessário compreender melhor a rota biossintética desse metabólito microbiano. A bactéria *P. aeruginosa* vem sendo amplamente estudada, pois apresenta bons níveis de produção (MÜLLER et al, 2010).

Diversos autores tem se dedicado à elucidar a síntese dos ramnolipídios (OLVERA et al., 1999; ROBERTSON et al., 1994; CAMPOS-GARCIA et al., 1998; DÉZIEL et al., 2003). Entretanto, ainda existem algumas lacunas importantes a serem preenchidas, uma delas em relação ao gene *rhlG*, pois existem divergências na literatura quanto a relação da proteína RhlG e a produção de ramnolipídios. Campos-Garcia et al., (1998) relatam que essa proteína, seria responsável pela síntese da porção lipídica dos ramnolipídios. Entretanto, Zhu e Rock (2008) corroboraram com os resultados de Déziel et al., (2003) propondo que só ocorre formação de ácidos hidroxialcanóicos (AHA) na presença da proteína RhlA. Os autores sugerem que a porção lipídica é sintetizada através da clássica rota de síntese de ácidos graxos a partir de duas unidades de carbono (FASII). Porém os autores abdel-Mawgoud et al, (201) relatam que a β -oxidação também influencia na produção desses metabólitos microbianos, uma vez que a inibição da mesma leva a uma redução na produção dos ramnolipídios, mesmo quando a fonte de carbono utilizada é hidrofílica. Os autores relatam ainda em seu trabalho que os genes *rhlY* e *rhlZ* organizados em um pequeno operon podem estar relacionados a produção dos ramnolipídios via β -oxidação, porém esse foi o primeiro trabalho analisando esses genes, sendo assim necessário mais avaliações a cerca desse operon.

Lovaglio (2011), observou que cepas mutantes com deleção do gene *rhlG* apresentaram drástica redução na produção de ramnolipídios, quando se utilizou óleo de

girassol como fonte de carbono, sugerindo uma nova hipótese sobre a relação deste gene com a produção deste glicolípido.

De acordo com Guerra-Santos *et al.*, (1984) a fonte de carbono utilizada é um dos principais fatores que influencia a composição e distribuição de homólogos em uma mistura de ramnolipídios. Portanto, o emprego de fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas, podem fornecer informações sobre as rotas metabólicas utilizadas pelo micro-organismo para a síntese da molécula anfipática dos biossurfactantes, além de permitir o estudo da influência das fontes de carbono na composição de homólogos.

Segundo Müller e Hausman., (2011) para aumentar o desenvolvimento do processo de produção de ramnolipídios, há necessidade de informações detalhadas sobre a regulação da produção de ramnolipídios durante cultivos em biorreator e assim, delinear estratégias baseadas no conhecimento genético e de engenharia de processos.

A engenharia metabólica permite otimizar a produtividade e fatores de conversão de substrato aos produtos de interesse através da análise de fluxos metabólicos (AFM), que podem ser determinados através das medidas de velocidades específicas de produção e consumo de metabólitos, intra e extracelulares (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998). A análise de fluxo metabólico pode ser feita também através de experimentos onde se emprega substratos rastreadores como o isótopo estável ^{13}C e os resultados obtidos permitem a elaboração de um mapa metabólico com um diagrama das principais reações bioquímicas envolvidas e a estimativa das velocidades de cada passo em estado estacionário (GOMBERT e NIELSEN, 2000).

Dessa maneira o presente trabalho aplicou análise fluxo de carbono nas linhagens mutantes *P. aeruginosa* MPAO1 ΔrhlG , *P. aeruginosa* MPAO1 ΔrhlYZ e *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta\text{rhlG} \Delta\text{rhlYZ}$ comparando as com a linhagem selvagem altamente produtora de ramnolipídios *P. aeruginosa* MPAO1.

4.2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Apesar dos ramnolipídios serem os glicolipídios mais bem estudados ao longo dos últimos 60 anos, econômica esses biosurfactantes ainda não são competitivos comparados aos surfactantes sintéticos. O entendimento dos mecanismos de biossíntese e regulação utilizados pelo micro-organismo produtor são de suma importância para o desenvolvimento de estratégias que visem o aumento da produção.

As mutações randômicas podem não acarretar em aumento na biossíntese do produto, devido aos mecanismos de compensação regulatórios existentes em *P. aeruginosa*. Por isso o estudo do fluxo de carbono nas rotas metabólicas envolvidas na produção de ramnolipídios pode auxiliar no entendimento dos mecanismos bioquímicos utilizados pela bactéria e com isso auxiliar no direcionamento da modificação genética, acarretando em um aumento na síntese do tensoativo.

O presente estudo se propôs a estudar o fluxo de carbono em uma linhagem que apresenta alta produção desse metabólito, *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 e em seus mutantes com deleção nos genes *rhlG* *rhlYZ* ou ambos. Afim de entender o fluxo de carbono nessa bactéria e o papel desses genes na formação desse metabólito microbiano de interesse industrial.

4.3 OBJETIVOS

- Realizar cultivos utilizando óleo de girassol e traçar a cinética do bioprocesso da linhagem selvagem e dos mutantes com deleção no gene *rhlG* ou no operon *rhlYZ* ou com a dupla deleção do operon *rhlYZ* e do gene *rhlG*
- Realizar cultivos utilizando glicerol como fonte de carbono e avaliar o perfil fenotípico das linhagens *P. aeruginosa* MPAO1 Δ *rhlG*, *P. aeruginosa* MPAO1 Δ *rhlYZ* e *P. aeruginosa* MPAO1 Δ *rhlG* Δ *rhlYZ* e comparar com a linhagem selvagem *P. aeruginosa* MPAO1.

- Traçar o fluxo metabólico das linhagens citadas acima em ambas as fontes de carbono
- De posse do fluxo metabólico das diferentes cepas inferir a respeito de possíveis modificações genéticas que favoreceriam a produção de ramnolipídios

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Micro-organismos utilizados

Os micro-organismos utilizados nessa etapa de trabalho foram a *P. aeruginosa* MPAO1, oriunda do banco de micro-organismos do Institute of Applied Microbiology – iAMB da RWTH Aachen university, que se encontrava condicionada a -80°C, e os mutantes construídos na capítulo anterior, sendo eles *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG, *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlYZ e *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG Δ rhlYZ, os mesmos também estavam armazenados a -80°C.

4.4.2 Meios de cultura

4.4.2.1 Caldo Lisogênico (LB)

A composição do meio utilizado para a reativação dos micro-organismos foi: triptona – 10 g/L; extrato de levedura – 5,0 g/L e NaCl – 10 g/L(LB).

4.4.2.2 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTP)

O meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato possui a seguinte constituição em (g/L): MgSO₄ 7H₂O - 0,05; KCl - 0,1; NaNO₃ - 1,5; tampão fosfato 0,1mol/L(constituído de fosfato de potássio mono e di-básico) pH 6,5 e 1 mL/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g/L): citrato de sódio dihidratado – 2,0; FeCl₃ 6H₂O – 0,28; ZnSO₄ 7H₂O – 1,4; CoCl₂ 6H₂O – 1,2; CuSO₄ 5H₂O – 1,2; MnSO₄ H₂O – 0,8 (MÜLLER et al., 2010).

Esse meio foi utilizado no cultivo do micro-organismo, o qual foi usado como inóculo para o biorreator, as fontes de carbono utilizadas para o crescimento microbiano variaram de acordo com o experimento empregado, sendo elas: 62,5 g/L de óleo de girassol ou 50 g/L de glicerol P.A, dependendo da fonte de carbono a ser empregada nos experimentos em biorreatores.

4.4.2.3 Meio Mineral livre de cálcio

Para a produção de ramnolipídios em biorreator utilizou-se o meio mineral livre de cálcio (MÜLLER et al., 2010), composto por (g/L): K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KCl – 1,0; $NaNO_3$ – 15. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizada foram os mesmos descritos no item 4.4.2.2. As fontes de carbono utilizadas para o bioprocessamento variaram de acordo com o experimento empregado, sendo: 125 g/L de óleo de girassol ou 100 g/L de glicerol P.A; massa de reagentes utilizada nos meios descritos nos itens 4.4.2.2 e 4.4.2.3 foi baseada no volume de solução aquosa, não considerando o volume da fonte de carbono. Quando o processo atingiu os tempos de 20, 40, 70 e 120 horas foram adicionados ao reator 1 mL/ L da solução de elementos traço (item 4.4.2.2).

4.4.3 Condições de cultivo

4.4.3.1 Preparo do Inóculo

Os micro-organismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de meio LB e 100 μ L da cultura estoque da linhagem a ser avaliada, a incubação foi realizada em mesa agitadora durante 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida transferiu-se 1,25 mL do pré-cultivo para frascos de 500 mL contendo 25 mL de MLCTP e incubou-se por 24 horas à 30°C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para inóculo da fase aquosa do reator de maneira que a densidade ótica à 580nm fosse 0,1.

4.4.3.2 Biorreator

Os experimentos para cálculo das taxas(velocidades) e análise de balanço de fluxo foram feitos em biorreator de 3L (bioreactor Biostat A plus da Sartorius,) com volume útil (capacidade de trabalho) de 2L. O volume de meio de cultura empregado foi de 900mL de meio mineral, mais o volume da fonte de carbono e dos elementos traços. Os fermentadores controlavam diversos parâmetros da fermentação sendo eles: temperatura, que era mantida a 37°C, pH que foi fixado a 6,9 +/-0,2 (o pH foi mantido utilizando H₃PO₄ e NaOH ambas a soluções na concentração de 4M), pO₂ foi mantida a 5%, e a agitação cujo valor mínimo era 300 RPM, esse parâmetro podia variar com o intuito de manter de forma a manter a pO₂ em 5%, até atingir um máximo de 1000 RPM. O fermentador contava ainda com um sensor de antiespumante, com a finalidade de evitar vazamentos de material do reator, porém foi ainda acoplada a saída de ar do reator um frasco de 2L, para captar a espuma e permitir o retorno da mesma de maneira estéril ao biorreator utilizando uma bomba peristáltica (Figura 19)

A solução de elementos traços foi adicionada ao cultivo nos seguintes tempos: 0, 20, 40 e 70 horas. Os gases de saída foram continuamente analisados utilizando dois sensores bluesens uma para O₂ e outro para CO₂ as amostras retiradas 4 vezes por dia e o bioprocessos teve duração de 168h. A aeração foi mantida constante em 0,4v/vm e os cultivos foram realizados em duplicata.

Figura 19: Fermentador montado no início da fermentação ilustrando o setup do processo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.4.4 Métodos Analíticos

4.4.4.1 Amostras

O volume das três primeiras amostras foi de 5 mL, as mesmas foram lentamente misturadas ao mesmo volume de n-hexano. O volume das demais amostras foi de 10 mL, sendo divididas em duas de 5mL cada, para a análise, 5ml foram utilizados para quantificar a produção de ramnolipídios e consumo da fonte de carbono, adicionou-se a essas amostras n-hexano, como descrito para as primeiras amostras. A segunda parte dessas amostras foram usadas para quantificação da biomassa. Todas as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 ° C por 10 min. Em relação aos cultivos, utilizando glicerol como fonte de carbono, não houve adição de n-hexano às amostras, já que este é usado para extração do óleo de girassol presente nas mesmas e subsequente quantificação.

4.4.4.1.1 Quantificação de Ramnolipídios

A quantificação de ramnolipídios foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), de acordo com o descrito por Tiso et al., (2016). Após a etapa de centrifugação, para remoção das células, 500 µL do sobrenadante foi misturado ao mesmo volume de acetonitrila, agitado em vórtex e mantido sob refrigeração à 4 °C por um período mínimo de 4 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 17.000 x g, sendo que 250 µL do sobrenadante foram filtrados em viais utilizando filtros de seringa Phenex-RC (4 mm diâmetro, 0,2 mm de tamanho do poro - Phenomenex). A coluna usada nas análises foi a NUCLEODUR C18 Gravity (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemanha) (dimensões: 150 x 4.6 mm; tamanho de partícula: 3 mm). O sistema de HPLC Ultimate 3000 foi conectado ao detector de aerosol Corona-charged (CAD) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). O fluxo foi de 1 mL/min, e a temperatura do forno mantida em 40 °C, o volume de injeção da amostra

foi de 5 μ L. Como fase móvel, utilizou-se um gradiente binário de acetonitrila e água ultrapura, contendo 0.2% (v/v) de ácido fórmico. A concentração de acetonitrila aumentou linearmente de 70 para 100% nos tempos entre 1 e 9 minutos, em seguida houve um decréscimo linear de 100 para 70% entre 11 e 12 min, com término da corrida após 15 min. Foram utilizados padrões comprados da Agae.

4.4.4.1.2 Quantificação do Óleo de Girassol

O consumo do óleo de girassol foi realizado por cromatografia gasosa acoplado a um detector por ionização de chama (GC-FID). O óleo de girassol foi extraído da amostra usando n-hexano, como descrito previamente. Foram retirados 5 μ L do óleo extraído em n-hexano, essa alíquota foi dissolvida em 250 μ L de Metil-terc-Butil éter (MTBE). Em seguida, 100 μ L da mistura foi transferido para um vial com inserto e adicionou-se 50 μ L de ácido sulfônico em metanol. Para a derivatização, a mistura foi mantida a 80°C por 5 minutos. Para a quantificação do consumo de óleo de girassol utilizou-se os padrões de ácido oleico, esteárico, linoleico e palmítico.

4.4.4.1.3 Quantificação da Biomassa

A concentração de biomassa, expressa em g/L, foi determinada gravimetricamente. O caldo do cultivo (5 ml) foi centrifugado por 10 min à 10.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet de células foi lavado com 5 mL da mistura NaCl 0.9%: n-hexano na proporção 9:1. As células lavadas foram secas em estufa à 120°C por 24 horas e pesadas em um analisador de umidade.

4.4.5 Análise de Balanço de Fluxo

O protocolo seguido foi o descrito por Krömer et al., (2014), onde para cada amostra retirada foi analisado a concentração de biomassa, produção de CO₂ e ramnolipídios, bem como, o consumo de O₂ e da fonte de carbono. Em seguida foram calculadas as taxas

específicas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto. O próprio programa utilizado para análise de consumo/ produção de gases, calculou automaticamente as taxas de consumo de oxigênio e produção de CO₂. A análise de balanço de fluxo foi feita através de um modelo em escala genômica (OBERHARDT et al., 2011) e as análises foram executadas no programa COBRA Toolbox dentro da plataforma do Matlab, a função objetiva utilizada foi a velocidade do crescimento microbiano.

4.4.6 Análise estatística

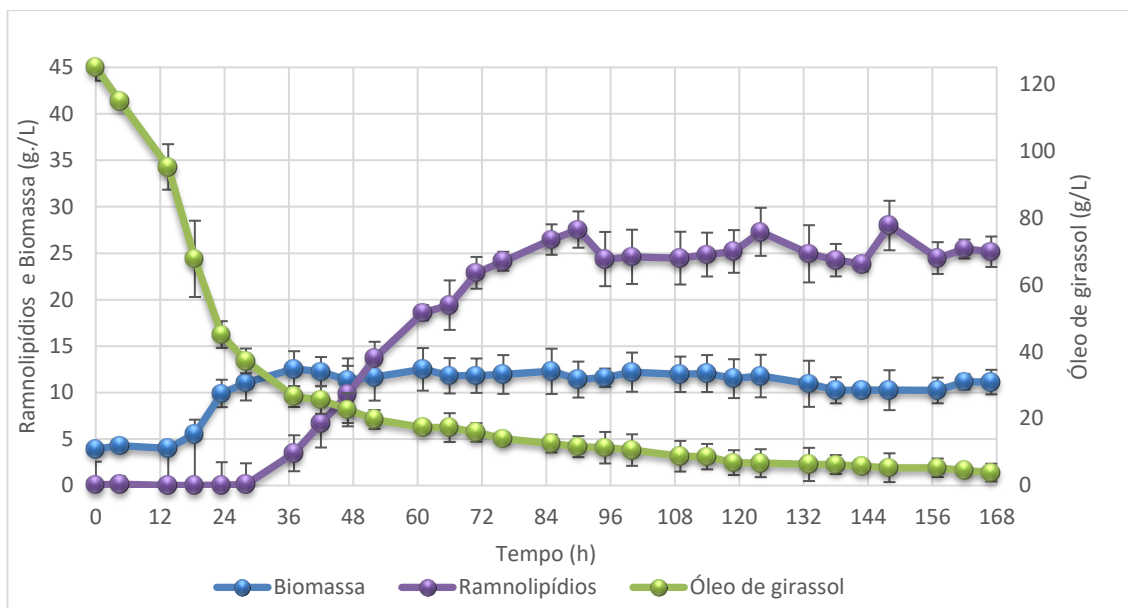
Os dados foram comparados utilizando análise de variância seguida por um teste de Tukey as diferenças significativas se deram com $P = 0,05$ (Sokal e Rohlf, 1995).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Bioprocessos utilizando óleo de girassol como fonte de carbono

A análise desses bioprocessos tem por finalidade comparar as cinéticas de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de substrato da linhagem selvagem *P. aeruginosa* MPAO1 e seus mutantes *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG, *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlYZ e *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG Δ rhlYZ. A figura 20 apresenta os perfis de crescimento, consumos de óleo total e produção de biotensoativo total da linhagem selvagem.

Figura 20: Cinética de produção de ramnolipídios da linhagem selvagem (*P. aeruginosa* MPAO1) utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A máxima produção de ramnolipídios pela linhagem selvagem utilizando óleo de girassol como fonte de carbono foi de 27,30 g/L, apresentando assim uma boa produção quando comparada com a literatura. Müller et al, (2010), relatam uma produção de 39 g/L porém em seu trabalho os autores utilizaram o dobro da fonte de carbono utilizada nesse bioprocessos, o que resulta em um fator de conversão produto por substrato ($y_{p/s}$) de 0,1560g/g inferior ao atingido no presente trabalho que foi de 0,2180g/g.

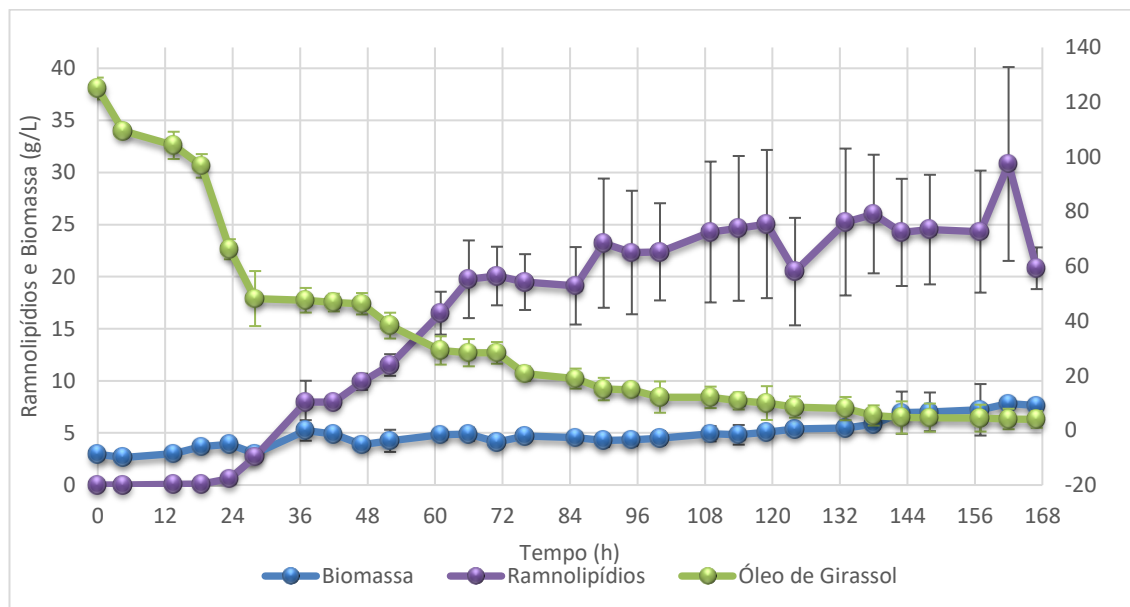
Após 37 horas, o crescimento bacteriano atinge a fase estacionária, se mantendo por volta de 10 a 12 g/L de biomassa, sendo o crescimento máximo de 12,5g/L. Com relação ao consumo da fonte de carbono, no período de 28h já haviam sido consumidos mais de 80 g/L da fonte de carbono o equivalente a dois terços do total empregado no bioprocessos.

A produção de ramnolipídios até as 28 horas foi praticamente nula, o que sugere que o consumo da fonte de carbono nessas primeiras horas foi direcionado para manutenção e crescimento da bactéria, após esse período, o consumo do óleo de girassol é direcionado

para a produção de ramnolipídios e manutenção celular (a massa seca se mantém constante), por outro lado o bioprocesso entra no período de alta produção desse metabólito microbiano.

Na Figura 21 pode-se visualizar a cinética da linhagem com a deleção no gene *rhlG*.

Figura 21: Perfil de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de óleo de girassol da linhagem com a deleção no gene *rhlG*.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Pode-se verificar que o crescimento microbiano foi reduzido, chegando a 7,8g/L de biomassa no seu ponto máximo, o que difere dos resultados encontrados por Campos-Garcia et al., (1998), que verificou em seu trabalho que a deleção do gene *rhlG* não afeta o crescimento microbiano.

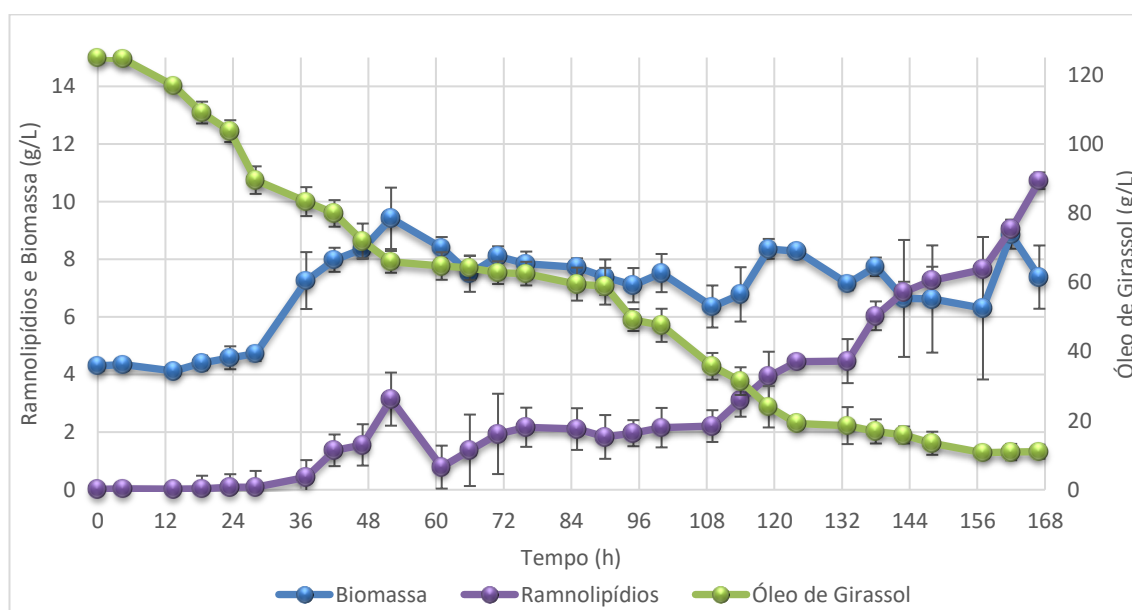
O consumo do óleo de girassol também foi mais lento no período de 28 a 46 horas (com 28 horas de processo ainda haviam 48,20 g/L de óleo de girassol), a quantidade de óleo consumido só se igualou a da linhagem sem a deleção após 85 horas.

A produção máxima de ramnolipídios foi ligeiramente maior que a observada pela linhagem selvagem, porém não existe diferença estatística entre a produção máxima da linhagem selvagem e do mutante *P. aeruginosa* MPAO1Δ*rhlG* ($P = 0,062$), o que

contraria o observado por Lovaglio (2011) que relatou uma diminuição na produção dos ramnolipídios quando da ausência desse gene.

Porém se avaliamos a produção de ambas as cepas pode-se notar que no período de 0 a 66 horas o perfil de produção do mutante $\Delta rhlG$ e da linhagem selvagem são similares, contudo de 66 até 90 horas o mutante passa a produzir menos biotensoativos que a linhagem selvagem, após esse período a produção volta a ser similar, essa observação é importante, pois se o bioprocessamento fosse encerrado com 85h poder-se-ia inferir erroneamente que a produção de ramnolipídios foi prejudicada com a deleção do gene *rhlG*.

Figura 22: Cinética de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de óleo de girassol da linhagem com a deleção do operon *rhlYZ*.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

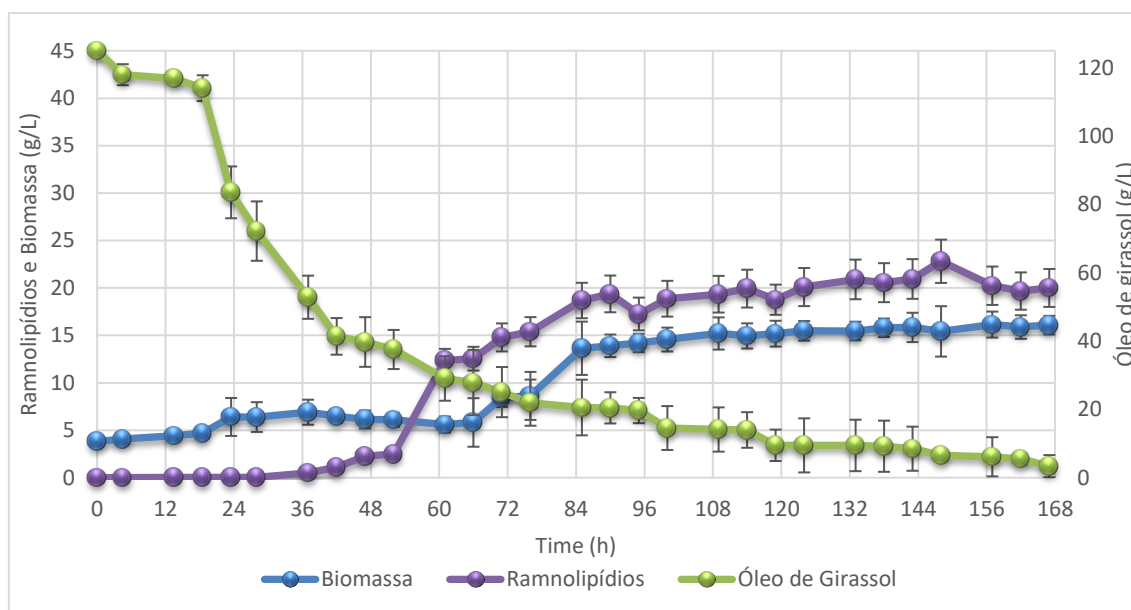
Pode-se verificar que assim como ocorreu com a linhagem anterior a produção de biomassa microbiana foi prejudicada, resultando numa biomassa máxima de apenas 8,4 g/L, com 52h de processo.

Além disso, a produção de ramnolipídios com a deleção desse operon (*rhLYZ*) foi reduzida para 38,35% da produção total apresentada pela cepa selvagem, dessa maneira pode-se inferir que a deleção desse operon influencia negativamente a produção dos ramnolipídios, evidenciando assim a importância do mesmo nessa complexa rede de fatores relacionados a produção desse biossurfactante.

Os autores Abdel-Mawgoud et al, (2014), relataram em seu trabalho que esses genes estão relacionados a produção da cadeia de ácidos graxos dos ramnolipídios, diretamente da β -oxidação, o que está de acordo com o resultado encontrado em nosso trabalho, uma vez que a deleção desse operon prejudicou a produção desse metabolito microbiano, quando utilizou-se fonte de carbono hidrofóbica, o que pode indicar que sem esse desvio da β -oxidação que é realizado pelo operon *rhLYZ* a produção do biossurfactante é reduzida.

O consumo de óleo de girassol também teve sua velocidade reduzida, quando comparado as linhagens anteriores, porém o consumo final da fonte de carbono foi estatisticamente igual para todas as linhagens avaliadas.

Figura 23: Perfil do bioprocesso, apresentando o consumo de óleo de girassol, o crescimento microbiano e a produção de ramnolipídios, quando utilizada linhagem *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhIG\Delta rhIYZ$.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os resultados apresentados na Figura 23, mostram que a linhagem *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhIG\Delta rhIYZ$ apresenta consumo da fonte de carbono bastante similar ao apresentado pela linhagem com deleção do gene *rhIG*.

Com relação a produção de biomassa, a linhagem com deleção dupla foi a que apresentou maior crescimento utilizando fonte de carbono hidrofóbica. É interessante ressaltar que no início do bioprocesso o crescimento microbiano dessa linhagem se mostrava similar ao da *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhIG$, a qual apresentou o menor crescimento, porém, após 61 horas de fermentação a bactéria apresenta uma segunda fase de crescimento ultrapassando o crescimento apresentado pela linhagem selvagem e atingindo uma biomassa máxima de 16,08 g/L.

Esse fato pode ter ocorrido devido a uma mudança metabólica da bactéria, que dessa forma passa a compensar a falta das enzimas produzidas pelos genes deletados, uma vez que o gráfico de crescimento se assemelha bastante ao de um crescimento diauxico. Essa

redução inicial no crescimento pode ainda ser resultado do estresse metabólico gerado pela deleção do operon *rhLYZ* e do gene *rhIG*.

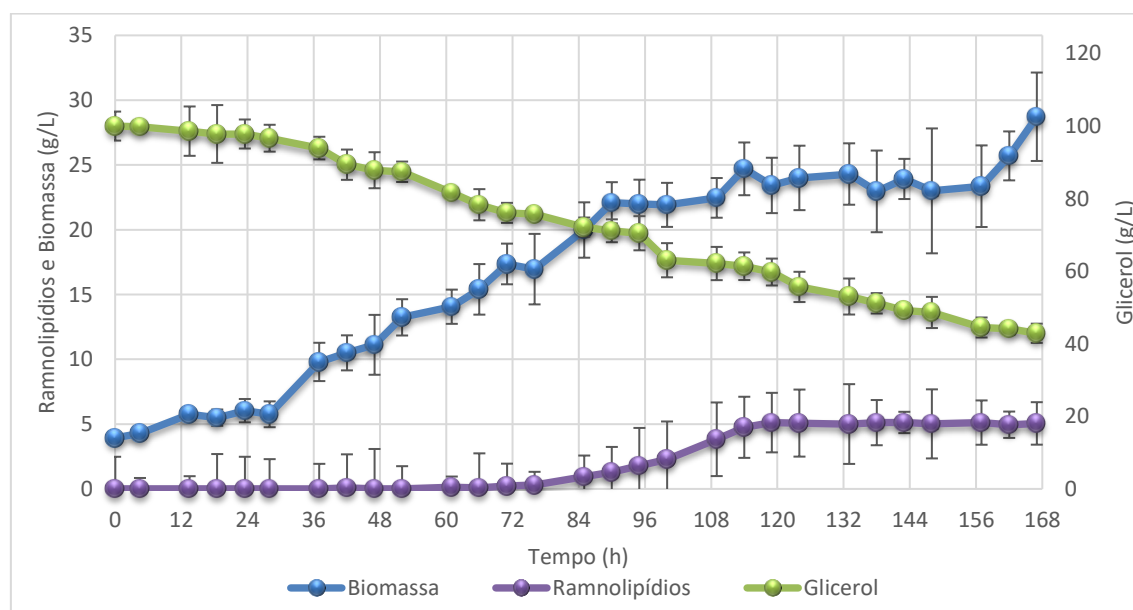
Com relação ao perfil de produção de ramnolipídios nota-se apenas um atraso da produção nas primeiras 52 horas, período em que o perfil de produção do mutante duplo é igual ao da linhagem com a deleção do operon *rhLYZ*, divergindo a partir desse ponto e atingindo uma produção máxima de 22,8 g/L.

A produção média máxima desse mutante não apresenta diferença estatística quando comparada a produção média máxima do mutante ($P = 0.057$) *rhIG* e da linhagem selvagem. Mediante a esses resultados pode-se inferir que a dupla deleção provavelmente levou a mecanismos de compensação que possibilitaram uma produção duas vezes maior que a do mutante $\Delta rhLYZ$.

4.5.2 Bioprocessos utilizando glicerol como fonte de carbono

A Figura 24 apresenta o perfil fenotípico da linhagem selvagem quando a fonte de carbono utilizada foi glicerol.

Figura 24: Cinética de produção consumo e crescimento da bactéria *P. aeruginosa* MPAO1 utilizando glicerol como fonte de carbono.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

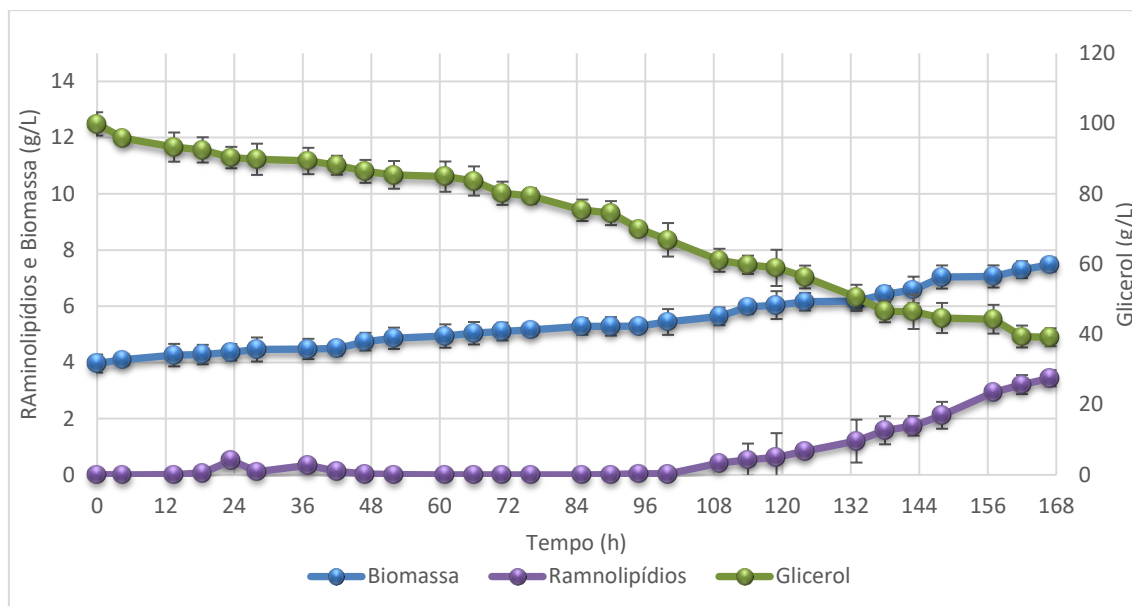
Quando a fonte de carbono utilizada no bioprocesso foi glicerol nota-se que a produção de ramnolipídios é reduzida drasticamente. A produção máxima utilizando essa fonte de carbono foi de 5,05g/L, o que equivale a apenas 18% da produção utilizando óleo de girassol, o que está de acordo com o verificado em estudos prévios (SILVA, 2014) em que foi possível verificar que a produção de ramnolipídios é favorecida pela presença de fontes de carbono hidrofóbicas.

Porém a biomassa máxima foi de 28,72g/L, superior em mais de 10g/L daquela apresentada pela mesma linhagem utilizando óleo de girassol. Esse fato pode ser explicado pelo direcionamento do fluxo de carbono para a formação de ramnolipídios na presença da fonte oleosa em detrimento da biomassa.

Ao término do processo, ainda restavam 42,82g/L de glicerol, apresentando um consumo menor que 60% da fonte de carbono empregada; porém a produção de ramnolipídios já havia estabilizado, não sendo interessante do ponto de vista produtivo a continuidade do processo.

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos utilizando o mutante com a deleção no gene *rhIG*, utilizando 100g/L de glicerol.

Figura 25: Perfil de produção consumo e crescimento da bactéria *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhlG$ utilizando glicerol como fonte de carbono.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

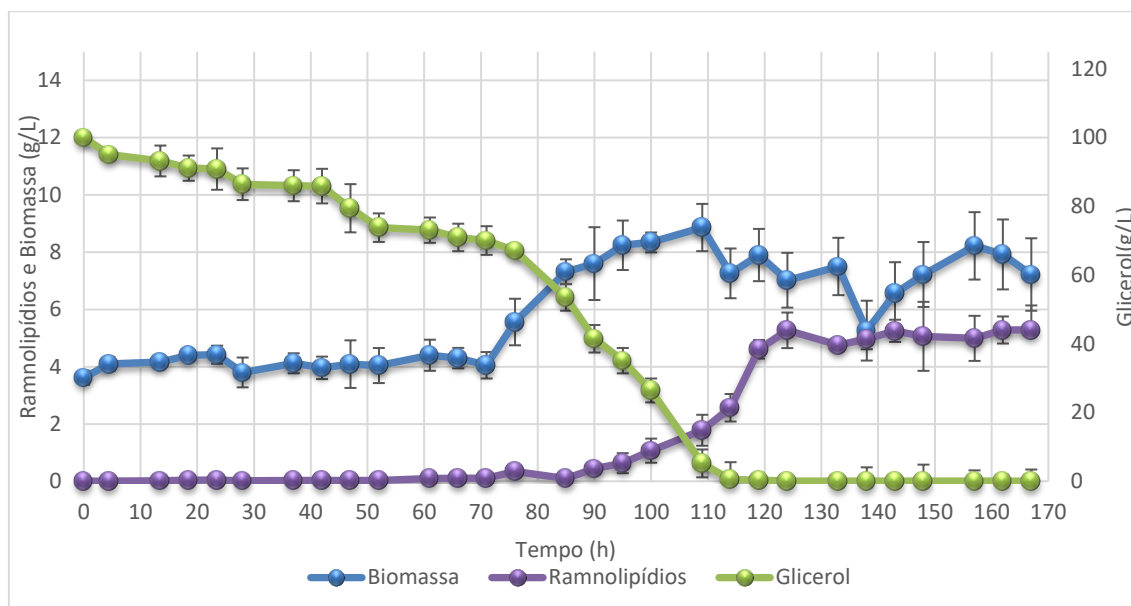
Essa cepa apresentou um consumo de glicerol ligeiramente maior quando comparada a linhagem selvagem sendo seu consumo máximo 61g/L da fonte de carbono ao termino do bioprocesso, o que dá uma diferença de aproximadamente 3g/L com relação a *P. aeruginosa* MPAO1.

Porém mesmo com um consumo maior da fonte de carbono a linhagem com a deleção no gene *rhlG* apresentou uma produção ligeiramente inferior a selvagem atingindo o máximo de 3,44g/L de raminolipídios, o que contraria os resultados obtidos quando a fonte de carbono utilizada foi óleo de girassol, demonstrando que esse gene pode ser mais importante para a produção de raminolipídios quando a fonte de carbono utilizada é hidrofílica.

O crescimento também foi prejudicado na ausência do gene *rhlG*, uma vez que o mutante apresentou um crescimento 3 vezes menor que o da linhagem selvagem na mesma fonte de carbono, sendo que esses resultados corroboram com os resultados obtidos utilizando óleo de girassol como fonte de carbono, em que o mutante também apresentou menor crescimento que a linhagem selvagem.

A deleção do gene *rhIYZ*, também acarretou uma redução no crescimento microbiano (Figura 26), tal como observado no mutante $\Delta rhIG$.

Figura 26: Perfil cinético do mutante *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhIYZ$.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

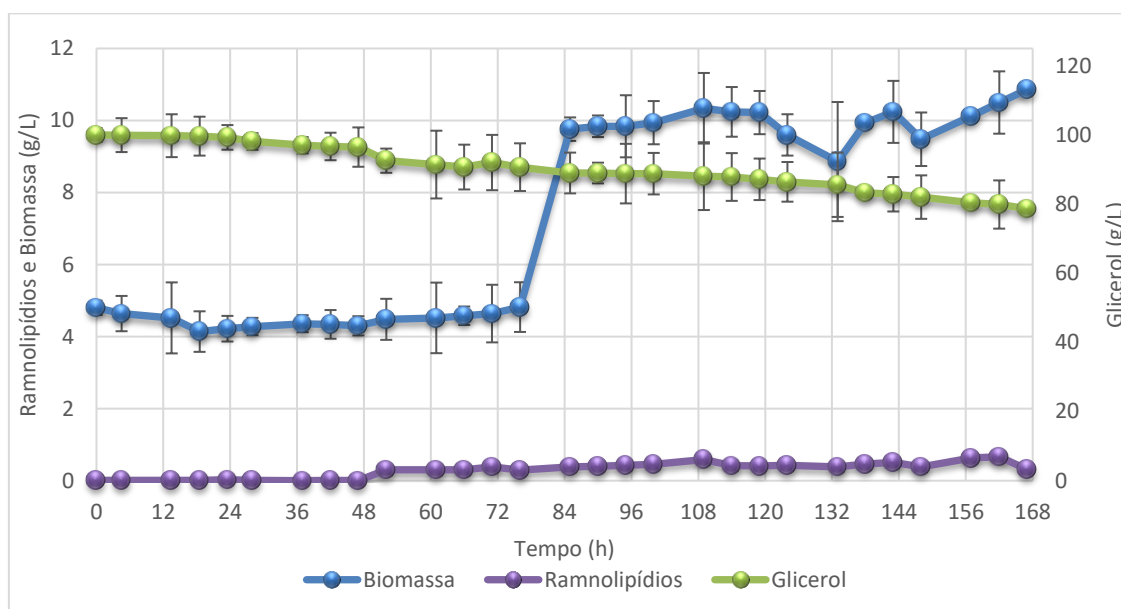
Porém nesse caso a produção de ramnolipídios não foi afetada, uma vez que a cepa *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhIYZ$, apresentou uma produção semelhante à da linhagem selvagem quando da utilização de glicerol como fonte de carbono, sendo a diferença entre as produções máximas de ambas de apenas 0,20g/L.

O perfil de produção dessas duas linhagem foi bastante parecido também. A única diferença é que a cepa mutante apresentou um atraso na produção do biossurfactante, tendo iniciado uma produção expressiva após 85 horas enquanto a linhagem selvagem já apresentava produção com 71 horas. Portanto o operon *rhIYZ* não apresenta uma relevância para a produção de ramnolipídios quando a fonte de carbono utilizada é glicerol. Esse comportamento contraria o observado por Abdel-Mawgoud et al, (2014), que relatam uma redução na produção de ramnolipídios na ausência desse gene mesmo utilizando o meio de cultura glicerol como fonte de carbono.

Com relação ao consumo de glicerol o mutante $\Delta rhlYZ$ apresentou maior consumo, sendo mais acentuado a partir de 76 horas e praticamente esgotando a fonte de carbono com 114 horas de bioprocesso. Porém a eficiência de conversão da fonte de carbono no bioproduto foi menor que a da linhagem selvagem, uma vez que o consumo de glicerol foi maior e a produção de ramnolipídios foi semelhante.

A Figura 27, apresenta o perfil do cultivo realizado utilizando o mutante com a dupla deleção tanto do operon $rhlYZ$ como do gene $rhlG$.

Figura 27: Perfil cinético do mutante *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhlYZ\Delta rhlG$.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Pode-se notar que o mutante com a dupla deleção apresentou o menor consumo de glicerol quando comparado as outras linhagens, apresentando uma quantidade residual de glicerol de 73,6g/L de glicerol ao término do processo. A deleção dupla foi prejudicial ao consumo da fonte de carbono empregada. Porém o crescimento microbiano desse mutante foi ligeiramente superior ao dos outros mutantes apresentando um crescimento máximo de 10,86g/L.

Com relação a produção, utilizando glicerol como fonte de carbono o mutante $\Delta rhlG\Delta rhlYZ$ também apresentou a menor produção, quando comparado as outras linhagens sendo a produção máxima de apenas 0,66g/L de ramnolipídios, dessa forma a dupla deleção foi prejudicial para a produção final desse biossurfactante quando a fonte hidrofílica de carbono foi empregada, visto que ocorreu uma redução de 86,8% na produção quando comparado a linhagem selvagem.

4.5.3 Análise de balanço de fluxo nas rotas envolvidas na produção de ramnolipídios pelas linhagens *P. aeruginosa* MPAO1, *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhlG$, *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhlYZ$ e *P. aeruginosa* MPAO1 $\Delta rhlG\Delta rhlYZ$ utilizando óleo de girassol como fonte de carbono

As análises de fluxo metabólico foram realizadas no período de 28 a 37 horas para os bioprocessos empregando óleo de girassol como fonte de carbono. Já para os processos utilizando glicerol como fonte de carbono o intervalo analisado foi de 76 a 109 horas, pois nesses momentos os bioprocessos se apresentavam em uma fase pseudo-estacionária (“pseudo steady state”).

Para a realização das quantificações de fluxo aplicou-se o modelo de escala genômica, que permite quantificar as velocidades das reações através de taxas específicas de consumo de substrato, formação de produto e biomassa (BLANK; KUEPFER., 2010). O modelo utilizado para estimar os fluxos compreende a maioria das rotas metabólicas da linhagem *P. aeruginosa* PAO1 que é considerada a linhagem tipo dessa espécie e modelo pra produção de ramnolipídios (OBERHARDT et al., 2011; MÜLLER et al, 2010).

Vale ressaltar que o modelo utilizado não compreende todos os homólogos de ramnolipídios quantificados e apresentados nos gráficos anteriores, apenas os mono e o di-ramnolipídios C10-C10 estão inclusos no modelo, excluindo-se assim outros

congêneres que fazem parte dos resultados apresentados anteriormente. Para alimentar o modelo as velocidades foram calculadas na unidade mM.(g de biomassa.^{h-1}).

A função objetivo do modelo utilizada para validar os dados obtidos foi a velocidade específica de crescimento, denominada no modelo com f . A tabela abaixo apresenta os valores de f calculados e os valores obtidos após a alimentação do modelo para verificar a validade dos dados obtidos (Tabela 3).

Tabela 3: Velocidades específicas de crescimento, calculadas e obtidas pelo modelo em todos os bioprocessos.

Linhagem	Fonte de carbono	velocidade específica calculada	velocidade específica obtida pelo modelo
<i>P. aeruginosa</i> MPAO1	Óleo de Girassol	0,014	0,013
	Glicerol	0,0085	0,0103
	Óleo de Girassol	0,0328	0,0413
<i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ rhlG	Glicerol	0,0027	0,2656
	Óleo de Girassol	0,0478	0,036
	Glicerol	0,0237	0,0254
<i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ rhlYZ	Óleo de Girassol	0,0475	0,0435
	Glicerol	0,0216	0,0264
	Óleo de Girassol	0,0475	0,0435
<i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ rhlG Δ rhlYZ	Glicerol	0,0216	0,0264
	Óleo de Girassol	0,0475	0,0435

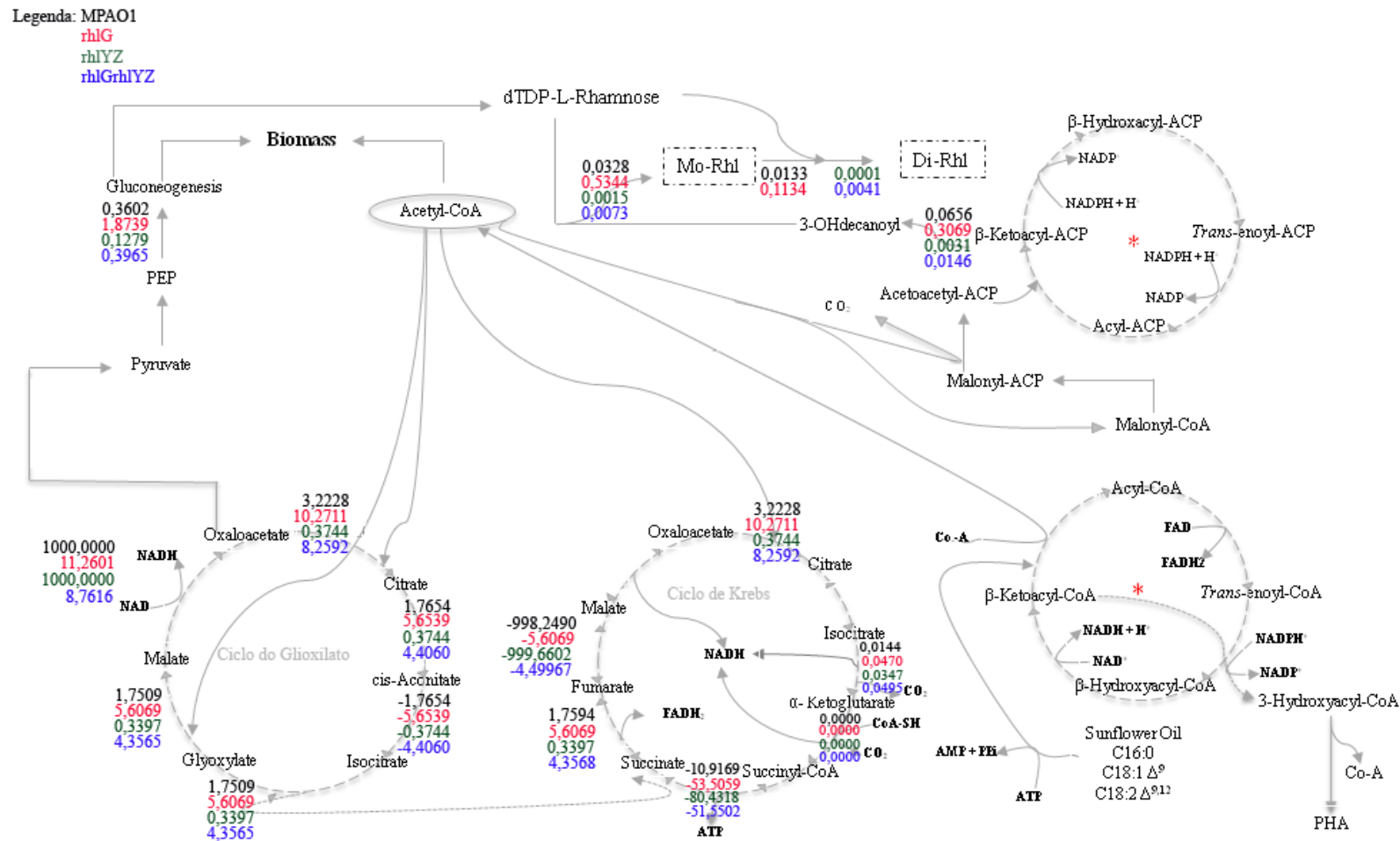
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Vale ressaltar que todas as velocidades calculadas ficaram próximas as obtidas pelo modelo, exceto pelo bioprocesso utilizando a linhagem *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG, e glicerol como fonte de carbono, nesse caso a velocidade específica de crescimento calculada foi 100 vezes menor que a obtida pelo modelo. Dessa maneira é necessário ter esse dado em mente para avaliar os dados resultantes desse processo.

Nos cultivos utilizando óleo de girassol como fonte de carbono as maiores velocidades específicas de crescimento foram obtidas nos cultivos utilizando os mutantes *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlYZ e *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG Δ rhlYZ, o que ocorre devido ao um crescimento tardio dessas linhagens.

A figura (Figura 28) apresenta os fluxos obtidos nos bioprocessos utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.

Figura 28: Figura apresentando os fluxos metabólicos dos bioprocessos realizados utilizando óleo de girassol como fonte de carbono. A legenda no canto superior da figura mostra que cada cor de fluxo representa uma linhagem diferente.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A produção de PHA não foi calculada, uma vez que estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que a taxa de produção desses polímeros é muito baixa, não sendo considerada pelo modelo utilizado (dados ainda não publicados).

É importante ressaltar que o modelo utilizado não prevê nenhum desvio de fluxo direto da β -oxidação para a produção dos precursores da porção lipídica dos ramnolipídios, como proposto por (ABDEL-MAWGOUD et al., 2014).

No período analisado pode-se observar que a linhagem *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG apresenta o maior fluxo direcionado para a produção de ramnolipídios, mais uma vez contradizendo Campos-Garcia et al., (1998), que relata que a deleção desse gene acarreta na não produção desse biotensioativo.

É importante ressaltar que a deleção do gene *rhlG* favoreceu o fluxo para a produção de ramnolipídios uma vez que mesmo o duplo mutante *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlG Δ rhlYZ, apresentou um fluxo maior que o mutante *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlYZ, que não apresenta deleção no gene *rhlG*.

A deleção do gene *rhlYZ* também alterou o fluxo de carbono direcionado a produção de ramnolipídios, o mutante *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhlYZ apresentou um fluxo mais de 20 vezes menor que o obtido pela linhagem selvagem para a formação de mono ramnolipídios e 100 vezes inferior para a formação de di ramnolipídios, o que corrobora com os autores abdel-Mawgoud et al, (2014), que ressaltam a importância desse gene para a produção desse metabolito microbiano.

A

Tabela 4 apresenta os fluxos obtidos em cada ciclo da β -oxidação pelas diferentes linhagens nos bioprocessos utilizando fonte de carbono hidrofóbica.

Tabela 4: Fluxo obtidos em cada ciclo da β -oxidação pelas diferentes linhagens nos bioprocessos utilizando óleo de girassol.

	C16:0				C18:0			
	MPAO1	Δ rhIG	Δ rhIYZ	Δ rhIG Δ rhIYZ	MPAO1	Δ rhIG	Δ rhIYZ	Δ rhIG Δ rhIYZ
1º Ciclo	0,1680	0,4203	0,2228	0,5520	0,1680	0,4203	0,7078	0,5520
2º Ciclo	0,1680	0,4203	0,2228	0,5520	0,1680	0,4203	0,2228	0,5520
3º Ciclo	0,4958	1,2076	1,5639	1,6274	0,1680	0,4203	0,2228	0,5520
4º Ciclo	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466	0,4958	1,2076	1,5639	1,6274
5º Ciclo	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466
6º Ciclo	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466
7º Ciclo	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466
8º Ciclo	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199
9º Ciclo	-	-	-	-	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199

	C18:1				C18:2			
	MPAO1	Δ rhIG	Δ rhIYZ	Δ rhIG Δ rhIYZ	MPAO1	Δ rhIG	Δ rhIYZ	Δ rhIG Δ rhIYZ
1º Ciclo	0,3278	0,7872	1,3411	1,0754	0,1117	1,1393	1,5180	0,4191
2º Ciclo	0,3278	0,7872	1,3411	1,0754	0,1117	1,1393	1,5180	0,4191
3º Ciclo	0,3278	0,7872	1,3411	1,0754	0,1117	1,1393	1,5180	0,4191
4º Ciclo	0,4958	1,2076	1,5639	1,6274	0,1117	1,1393	1,5180	0,4191
5º Ciclo	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466
6º Ciclo	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466
7º Ciclo	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466	0,6075	2,3470	3,0820	2,0466
8º Ciclo	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199
9º Ciclo	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199	0,5384	2,0287	3,0704	2,0199

O catabolismo dos ácidos graxos até acetil-CoA foi a principal rota utilizada devido à natureza da fonte de carbono empregada, a linhagem que apresentou o maior

fluxo para acetil-CoA foi *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhLYZ. Os outros dois mutantes também apresentaram um aumento nesse fluxo quando comparados a linhagem selvagem.

No caso do mutante *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhIG o fluxo maior voltado para a formação de acetil-CoA resultou em um subsequente aumento na formação do metabolito de interesse. Já quando o operon *rhLYZ* foi deletado não houve um posterior aumento no fluxo para a produção de ramnolipídios.

O mutante com dupla deleção apresentou um maior crescimento, evidenciando o direcionamento do fluxo de carbono para a formação de biomassa, porém o mutante *P. aeruginosa* MPAO1 Δ rhLYZ, não apresentou maior formação de biomassa nem de produção, o que sugere que o carbono esteja sendo direcionado pra formação de outro metabolito não quantificado.

A tabela abaixo apresenta os valores de fluxos de produção de ácidos graxos obtidos nos bioprocessos utilizando fonte de carbono hidrofóbica.

Tabela 5: Valores dos fluxos de síntese de ácidos graxos, obtidos nos bioprocessos utilizando óleo de girassol, para todas as linhagens estudadas.

Síntese de Ácidos Graxos	Distribuição de Fluxo			
	MPAO1	Δ rhIG	Δ rhLYZ	Δ rhIG Δ rhLYZ
1º Ciclo	0,06909	0,31827	0,01152	0,02266
2º Ciclo	0,06909	0,31827	0,01152	0,02266
3º Ciclo	0,06909	0,31827	0,01152	0,02266
4º Ciclo	0,06909	0,31827	0,01152	0,02266
5º Ciclo	0,00349	0,01138	0,00839	0,01198
6º Ciclo	0,00283	0,00923	0,00681	0,00972
7º Ciclo	0,00246	0,00803	0,00592	0,00846
8º Ciclo	0,00153	0,00498	0,00368	0,00525
9º Ciclo	0,00009	0,00028	0,00020	0,00029

A partir dos dados da Tabela 5, observa-se que a maior parte do fluxo entre o quarto e quinto ciclo da biossíntese de ácidos graxos é direcionado para a produção de ramnolipídios. Outros desvios de ácidos graxos vão para UDP-3-O-(3OH-C10:0)-N-acetil-glicosamina, *Pseudomonas* Lipídio A e 1,2-Diacil-sn-glicerol 3-fosfato. Portanto é importante dar mais atenção para a formação da ramnose, que pode ser nesse caso o gargalo para a produção de ramnolipídios. Assim torna-se interessante a realização de modificações genéticas que foquem no aumento do fluxo da porção hidrofílica desse biosurfactante, tal como, a super expressão do operon *rmlBDAC* responsável por encodar as enzimas relacionadas a produção de dTDP-l-raminose, vale ressaltar porém que esse operon possui uma intrincada rede de regulação, o que dificulta a sua super expressão (AGUIRRE-RAMÍREZ et al, 2012).

Afim de verificar esse gargalo na produção da porção hidrofílica dos ramnolipídios quantificou-se a produção dos ácido 3-hidroxyalkanoico (HAAs), precursor da porção hidrofóbica dos ramnolipídios. Os mesmo foram encontrados na forma livre no meio extra celular ressaltando a necessidade de estratégias que visem aumentar o fluxo de carbono para a produção de ramnose. A tabela abaixo mostra a produção do ácido 3-hidroxyalkanoico após 37 horas de bioprocesso.

Tabela 6: Quantidade de HAAs produzida com 37 horas de bioprocesso utilizando Óleo de girassol como fonte de carbono.

	MPAO1	$\Delta rhIG$	$\Delta rhIYZ$	$\Delta rhIG\Delta rhIYZ$
Produção de HAAs g/L	0,65286	0,01804	3,18416	0,01804

Pode-se verificar pela Tabela 6, que realmente há excedente de HAAs sendo secretado para o meio extracelular, reforçando assim a hipótese levantada anteriormente.

A Figura 29 apresenta os dados de fluxo calculados nos bioprocessos utilizando glicerol como fonte de carbono, pode- se verificar que ao utilizar o glicerol como fonte

de carbono, as linhagens selvagem e o mutante com deleção no gene *rhlYZ*, apresentam o maior fluxo para a formação de ramnolipídios. Deve-se lembrar que os fluxos da linhagem *P. aeruginosa* MPAO1 Δ *rhlG*, não podem ser levados em consideração uma vez que a função objetiva teve seu valor calculado 100 vezes menor que o valor resultante do modelo.

Pode-se observar ainda que o fluxo saindo do ciclo do glioxilato para a gliconeogênese é zero para todas as linhagens quando a fonte de carbono empregada foi glicerol. Dessa maneira todo o fluxo para a formação da molécula de ramnose é proveniente da transformação de glicerol em glicerol-3fosfato.

A tabela abaixo apresenta os fluxos anabólicos dos ácidos graxos quando a fonte de carbono utilizada foi glicerol.

Tabela 7: Valores dos fluxos de síntese de ácidos graxos, obtidos nos bioprocessos utilizando glicerol, para todas as linhagens estudadas.

Distribuição de Fluxo utilizando glicerol				
Síntese de Ácidos				
Graxos	MPAO1	Δ rhIG	Δ rhIYZ	Δ rhIG Δ rhIYZ
1º Ciclo	0,03975	0,07827	0,01367	0,00946
2º Ciclo	0,03975	0,07827	0,01367	0,00946
3º Ciclo	0,03975	0,07827	0,01367	0,00946
4º Ciclo	0,03975	0,07827	0,01367	0,00946
5º Ciclo	0,00285	0,07311	0,00699	0,00726
6º Ciclo	0,00249	0,06390	0,00611	0,00634
7º Ciclo	0,00231	0,05930	0,00567	0,00588
8º Ciclo	0,00125	0,03202	0,00306	0,00318
9º Ciclo	0,00007	0,00178	0,00017	0,00018

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota-se que para a cepa selvagem assim como ocorreu quando a fonte de carbono empregada foi óleo de soja há uma redução drástica no fluxo entre o 4º e o 5º ciclo, o que mais uma vez vai levar ao acúmulo dos HAAs; fato também observado mais uma vez para o mutante com a deleção no gene *rhIYZ*, porém essa redução foi mais gradual no mutante com a dupla deleção.

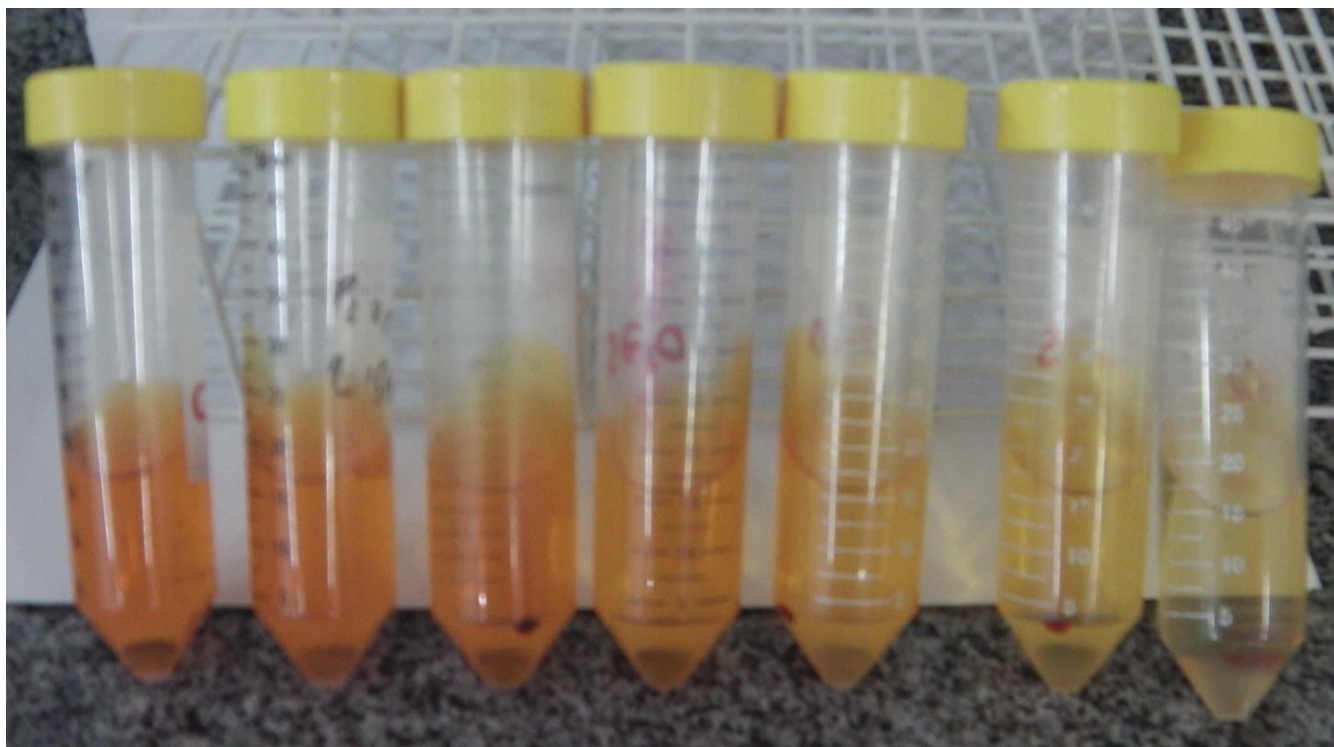
Porém quando a fonte de carbono utilizada foi glicerol apenas a linhagem selvagem apresentou produção extracelular de HAAs de 0,18g/L.

4.6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitem concluir que, o gene *rhlG* não é essencial para a produção de ramnolipídios como se acreditava anteriormente. Uma vez que sua deleção favoreceu a produção desse metabólito microbiano no mutante com a dupla deleção quando utilizou-se fonte de carbono hidrofóbica. Porém ao utilizar glicerol como fonte de carbono a produção de ramnolipídios foi prejudicada.

Já o operon *rhlYZ* possui bastante influência na produção desses biotensoativos, quando a fonte de carbono empregada é hidrofóbica, nessas condições a ausência desse gene levou a uma queda na produção. Porém não teve impacto na mesma quando a fonte de carbono utilizada foi o glicerol. Pode-se concluir ainda que a análise de fluxo metabólico é uma importante ferramenta para ajudar a desenhar novas linhagens visando a otimização da produção de ramnolipídios. Os resultados mostram que a formação da porção hidrofílica pode ser o gargalo na produção desse biotensoativo.

**5 CAPITULO IV- APLICAÇÃO DOS RAMNOLIPÍDIOS: ADSORÇÃO DE
CORANTES TEXTÉIS UTILIZANDO RAMNOLIPÍDIOS.**



5.1 INTRODUÇÃO

As indústrias têxteis são responsáveis pela geração de um grande volume de efluentes contendo corantes e compostos orgânicos tóxicos, tais como: Benzeno, tolueno, etil-benzeno, naftaleno, antraceno e xileno (GONG et al., 2007). Estes compostos e seus resíduos possuem efeitos mutagênicos e carcinogênicos, além de apresentarem potencial bioacumulativo (JESUS., 2005).

O ramo da indústria têxtil é responsável pelo consumo de um grande volume de água e geração de resíduos, com elevada carga orgânica e forte coloração dos efluentes (KUNZ, et al., 2002). Os corantes utilizados apresentam diferentes estruturas e interações químicas com o meio, o que exige um tratamento específico para cada classe de corante presente em um determinado resíduo (ROBINSON et al., 2001).

A classe que compreende os azos corantes representa 70% da produção mundial. Esses compostos apresentam como grupo cromóforo a interação da ligação azo ($-N=N-$) e espécies aromáticas, o que os tornam tóxicos e de difícil degradação no ambiente. (CARLILE, et al., 2004). Após a biotransformação desses pigmentos, pode ocorrer a formação de aminas aromáticas livres, benzidinas e outros intermediários com grande potencial mutagênico e carcinogênico (GUARATINI; ZANONI, 2000).

O tratamento de efluentes contaminados com azo-corantes é feito a partir de métodos físico-químicos tais como: degradação foto-eletroquímica, fluxo subcrítico, adsorção, entre outros, aliados as técnicas de oxidação avançadas, como a ozonização (BRUNELLI et al., 2009; HOSSEINI et al., 2010;). Entretanto, alguns tratamentos apresentam alto custo, demandam muito tempo, além de exigirem um grande espaço físico, o que faz com que muitas empresas do setor descartem os efluentes diretamente nos rios.

O método de tratamento por adsorção é uma alternativa viável, pois não apresenta os aspectos negativos citados, além disso, os adsorventes empregados podem ser biodegradáveis (LEVANDOWSKI; KALKREUTH., 2009). Materiais alternativos têm sido propostos para serem aplicados como adsorventes, tais como o bagaço de cana, pseudocaule de bananeira, casca de arroz, pecíolo de buriti, fibra de coco, carvão ativado, esterco bovino, serragem e cinzas de madeiras, entre outros (SILVA et al. 2010b; COSTA et al. 2009; ROSSITER et al. 2012; KADIRVELU et al. 2003; LEVANDOWSKI; KALKREUTH., 2009).

Os biossurfactantes são compostos de origem biológica, produzidos por diversos seres vivos, sendo os mais amplamente estudados para produção industrial, micro-organismos tais como: bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CAMEOTRA ; MAKKAR, 1998). Esses metabólitos microbianos podem ser empregados na limpeza de ambientes aquáticos e terrestres contaminados por petróleo e derivados e metais pesados (BANAT, 1995).

Os ramnolipídios estão entre os biossurfactantes mais efetivos na remoção de compostos hidrofóbicos do solo (BANAT, 1995), além disso podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, apresentam excelente biodegradabilidade e compatibilidade ambiental (BENINCASA et al, 2002; NITSCHKE et al, 2005a; COSTA et al, 2005;).

Esses biotensoativos provaram ser eficientes na remoção de petróleo bruto de areias contaminadas, além de poderem ser utilizados ainda na remoção de metais e resíduos de mineração em solo e água (COSTA et al 2010; VENKATESH ; VEDARAMAN, 2012; ARA ; MULLIGAN, 2008).

Relatos na literatura mostram que esses biossurfactantes podem ser utilizados para a remoção de corantes de efluentes aquosos. Wu et al, (2014), relatam que os ramnolipídios quando ligados ao óxido de grafeno foram capazes de remover o corante

azul de metileno de efluente, porém neste trabalho os autores utilizaram uma ligação química para favorecer a adsorção.

Devido ao alto potencial dos ramnolipídios na biorremediação o presente capítulo voltou-se para a aplicação desse composto biológico, produzido a partir de fontes renováveis, na remoção de um corante têxtil tóxico presente no efluente de indústrias desse setor. Focando dessa maneira o uso de uma molécula “verde” sem nenhuma modificação química para tratar um poluente que pode causar prejuízos ambientais.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo empregado nessa etapa do trabalho foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, o qual é proveniente de um banco de mutantes randômicos do Laboratório de Microbiologia Industrial – Depto de Bioquímica e Microbiologia – Unesp Rio Claro (LOVAGLIO, 2011). Esse micro-organismo encontra-se acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% v/v, em freezer a -80°C.

5.2.2 Meios de cultura

5.2.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato

O meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato possui a seguinte constituição em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,1; NaNO_3 - 1,5; tampão fosfato 0,1mol/L pH 6,5 e 1 mL/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g/L): citrato de sódio dihidratado - 2,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,28; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,4; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,8.

Esse meio foi utilizado no cultivo do micro-organismo, o qual foi usado como inóculo para o biorreator, as fontes de carbono utilizadas para o crescimento microbiano foi 125 g/L de óleo de soja.

5.2.2.2 Meio Mineral livre de cálcio

Para a produção de ramnolipídios em biorreator utilizou-se o meio mineral livre de cálcio, composto por (g/L): K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; KCl – 1,0; $NaNO_3$ – 15. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizada foram os mesmos descritos no item 4.2.2.1, a fonte de carbono utilizada foi óleo de soja na concentração de 250 g/L

A massa de reagentes utilizada, nos meios descritos nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2, foi baseada no volume de solução aquosa, não considerando o volume da fonte de carbono. Quando o processo atingiu os tempos de 20, 40, 70 e 120 horas foram adicionados ao reator 1 mL/ L da solução de elementos traço (item 4.2.2.1). A fermentação foi realizada em bioreactor labfors 3.

5.2.2.3 Extração e purificação dos ramnolipídios

A extração foi realizada de acordo com Silva et al, (2015), primeiramente um volume do caldo livre de células foi misturado ao mesmo volume de n-hexano (1:1), agitou-se vigorosamente até completa homogeneização. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso, até que houvesse a separação das fases. Descartou-se a fase contendo n-hexano/ óleo e adicionou-se H_3PO_4 85% 1:100 (v/v) à fase aquosa, levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do tensoativo utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em evaporador rotativo

obtendo assim os ramnolipídios. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

5.2.3 Experimentos de adsorção

O corante utilizado para os testes foi o Direct Orange 2GL, com grau de pureza de 70%. O corante Direct Orange 2GL é estável, não apresentando alterações no espectro de acordo com variações no pH, não apresentando desta forma efeito batocrômico e hipsocrômico (MENDES et al. 2015). A solução estoque corante foi preparada dissolvendo-se 1000 mg do corante em 1 L de água deionizada, resultando assim em um solução de 1mg.mL^{-1} , tal solução foi armazenada em um frasco âmbar a temperatura ambiente.

Na primeira etapa dos ensaios avaliou-se o efeito do pH na remoção do corante utilizando ramnolipídios, os experimentos foram realizados em Erlenmeyers contendo 20 mL da solução de corante com concentração de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$. Usando 1 mg/mL de ramnolipídios como material adsorvente, os testes foram realizados com a solução em repouso e a faixa de pH avaliada foi de 2,0 a 8,0. O experimento foi realizado à temperatura constante de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, o tempo de contato entre o biossurfactante e a solução de corante foi de 4 horas.

A concentração de corantes em solução antes e depois da adsorção foi determinada por análise em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu Model 2401 – PC, sendo a varredura feita na faixa de 200 a 800 nm. Antes de cada análise, a amostra foi centrifugada por 10 minutos, $10000 \times g$ 20°C . O melhor pH onde houve maior remoção do corante foi utilizado nos demais testes.

Em seguida, determinou-se a quantidade mínima de ramnolipídios necessária para remover todo o corante da amostra. Para isso utilizou-se os mesmos parâmetros do teste

anterior, variando apenas a concentração de biossurfactante avaliada numa faixa de 0,25 até 1,25 mg/mL.

5.2.3.1 Estudos de cinética e equilíbrio

Nesta etapa do estudo utilizou-se a mesma concentração de corante e volume dos testes anteriores (5.2.3). Para o estudo cinético utilizou-se uma solução contendo 1 mg/mL de ramnolipídios. O corante ficou em contato com o adsorvente por 105 minutos em temperatura constante de 20°C, sendo retirada uma alíquota do sobrenadante a cada 15 minutos, o material foi então submetido a uma varredura em espectrofotômetro UV-Vis por todo o espectro de luz visível.

Os estudos de equilíbrio de adsorção foram realizados variando-se a concentração de ramnolipídios (0.25 até 1.25 mg/mL) e a temperatura de cada amostra 283 a 313 K. Para calcular a concentração de equilíbrio, q_e (µg/mg), utilizou-se a Equação 1.

Equação 1:

$$q_e = \frac{V \cdot (C_o - C_e)}{W}$$

Onde: W representa a massa do adsorvente (mg), V é o volume de solução de corante (mL), C_o e C_e são as concentrações iniciais e de equilíbrio da solução de corante (µg/mL), respectivamente.

5.2.3.2 Recuperação do corante após a adsorção

Para recuperação do corante procedeu-se da seguinte maneira, em um Erlenmeyer com 20 mL de solução contendo do 100 µg/mL de corante, no pH ótimo de remoção, foi adicionado ramnolipídios até uma concentração final de 1.00 mg/mL.

Após 4 horas à 20°C o biossurfactante adsorvido ao corante, foi retirado da solução aquosa. Através de centrifugação por 5min a 10.000 g (o biossurfactante ligado ao corante permanecia precipitado no fundo dos frascos, porém para garantir a remoção total do mesmo era realizada a centrifugação), o sobrenadante foi retirado para análise em espectrofotômetro. Quantificou-se a porcentagem de corante adsorvido pelos ramnolipídios através da Equação 2.

Equação 2:

$$D(\%) = \frac{(C_o - C_e). 100}{C_o}$$

Em seguida adicionou-se 20 mL de água destilada aos ramnolipídios já adsorvidos ao corante (que ficaram no fundo do tubo falcon após a centrifugação) a fim de retornar esse material ao seu volume inicial, o pH dessa nova solução foi ajustado para 7,00 utilizando NaOH 4M sob agitação constante. Após a desorção dos ramnolipídios e do corante, a amostra foi centrifugada à 10000 x g, 10 minutos e 20°C. sendo o material novamente submetido a análise espectrofotométrica. Dessa forma quantificou-se a porcentagem de corante recuperado, e comparou-se com a porcentagem inicial para estimar a eficiência de recuperação.

5.2.3.3 Análise em espectrofotometria FT-IR

Os ramnolipídios e o corante em pó foram caracterizados por transformada de fourier infravermelho (FT-IR) em um espectrofotômetro Shimadzu Model 8300, antes e depois do teste de adsorção. As amostras foram aquecidas por 12h a 80 °C. Após isso os pellets de sal foram preparados utilizando 1mg da amostra seca e 149mg de KBr, os materiais foram homogeneizados e por 5min a 40 kN. Os pellets foram então analisados em espectrofotômetro FT-IR na faixa de 400 to 4.000 cm^{-1} com 16 escaneamentos a uma resolução de 4 cm^{-1} . As estruturas químicas e os gráficos foram realizados utilizando os softwares ACD/ChemSketch and Origin 6.10

5.2.3.4 Teste de toxicidade após a remoção do corante

Os testes de toxicidade foram conduzidos utilizando o microcrustáceo *Daphnia similis*, os mesmos foram cedidos pela equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa de Toxicidade de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP, campus de Rio Claro.

Os testes foram conduzidos de acordo com as normas técnicas da ABNT NBR 12713:2009 e CETESB L5. 022, 1991. Os organismos testes foram incubados em temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminação de 1000 Lux e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade e 8 horas de escuro. A alimentação foi realizada diariamente com 2 mL de suspensão da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de 3,0 a $3,5 \times 10^7$ Cel/mL (determinada mediante a contagem em câmara de Neubauer) e 1 mL de ração (ração para peixes + fermento).

A renovação da água de manutenção foi feita duas vezes por semana. A água utilizada foi coletada quinzenalmente no rio Ribeirão Claro, junto à captação da Estação de Tratamento de Água (ETA I) do Departamento Autônomo de Água e Esgoto (DAAE)

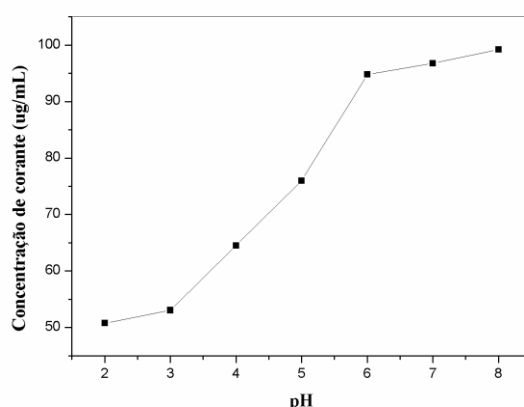
do município de Rio Claro, SP. Os crustáceos foram submetidos às concentrações de corante resultantes após a extração realizada com ramnolipídios.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 Experimentos de adsorção

A Figura 30 apresenta a concentração residual do corante após a remoção utilizando ramnolipídios nos diferentes valores de pH.

Figura 30: Concentração residual do corante Direct Orange 2GL após a remoção utilizando ramnolipídios em diferentes concentrações de pH.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota-se que em pH ácido houve maior eficiência na remoção do corante. A maior quantidade removida foi 49,20 µg/mL de corante, em pH 2,0, a sorção do corante também foi eficiente em pH 3,0 e 4,0, atingindo 47 e 35,5%, respectivamente. Já em pH alcalino a remoção foi muito baixa ou não ocorreu, como observado em pH 8,0.

De acordo com Araújo et al., (2006), durante o processo de adsorção, fatores como o pH da solução podem influenciar nas ligações químicas entre adsorbato e adsorvente, permitindo uma maior interação entre sítios de ligação e ocorrência de pontes

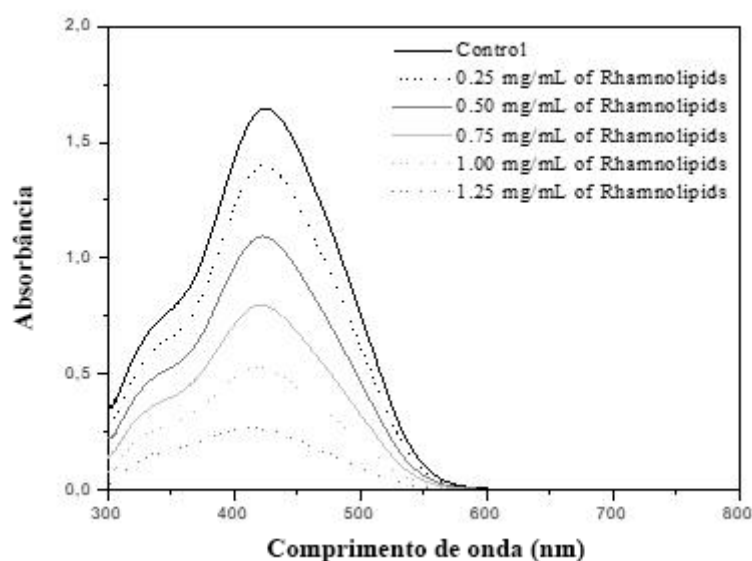
de hidrogênio, aumentando assim a capacidade de sorção do adsorvente. Neste estudo, observou-se que com o aumento do pH houve queda na capacidade de sorção dos ramnolipídios, indicando que a interação entre o biossurfactante e o corante Direct Orange 2GL é possivelmente uma interação influenciada pela protonação das moléculas em pH ácido, segundo Oliveira et al, (2013).

Ao analisar os valores obtidos nos pH 6,00, 7,00 e 8,00, nas quais a concentração de corante inicial não diminuiu, permanecendo próximos ao valor de 100 µg/mL, tem-se um indicativo que em pH neutro e alcalino os ramnolipídios não apresentam sítios de interação com o corante, não promovendo assim a adsorção. A partir desses resultados optou-se por realizar os demais estudos em pH 2,00, vale ressaltar que Oliveira et al, (2013) relatam em seu trabalho que a adsorção de ramnolipídios por carvão ativado também foi favorecida em pHs ácidos, os autores relatam ainda que a adsorção pode ser melhorada pelos grupos funcionais como os ácidos carboxílicos quando protonados em pH baixo.

O estudo da remoção do corante variando a massa de ramnolipídios mostrou que o espectro do corante não muda durante o processo de adsorção (Figura 31), isso indica que toda a molécula do corante está sendo removida pelo metabólito microbiano. Nota-se apenas uma redução na absorbância de uma maneira proporcional a quantidade de corante, sem nenhuma mudança no espectro, demonstrando que não há alteração na molécula do corante apenas uma redução na concentração do mesmo (GLENN ; GOLD., 1983). Essa é uma das vantagens de uma adsorção eficiente, pois nesse caso não há formação de moléculas mais tóxicas que a molécula inicial (RABELO et al., 2012). Outro fato observado é que esse material decanta após 3 horas, o que é importante para o tratamento de efluentes como descrito por Kuai et al., (1999). Vale ressaltar que em pH ácido os ramnolipídios tendem a precipitar tornando-se insolúveis em água, essa técnica

de acidificação é bastante utilizada para a purificação desse biossurfactante (SANTOS et al., 2013) sendo essa propriedade dos ramnolipídios a responsável pela decantação do corante adsorvido ao biotensoativo.

Figura 31: Gráfico do espectro de remoção do corante Direct Orange 2GL variando a concentração de ramnolipídios.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Utilizando os dados obtidos neste gráfico foi possível fazer uma regressão linear, determinando a massa mínima de ramnolipídios necessária para remover todo o corante da solução. Nas condições estudadas, e com uma concentração de 100 µg/mL de corante, seria necessário um total de 2,120 mg/mL de ramnolipídios para remover todo o corante.

Após os cálculos para verificar a quantidade de ramnolipídios necessária para a remoção completa do corante nas condições estudadas realizou-se o experimento anterior novamente, afim de comprovar se a concentração estimada realmente seria capaz de

adsorver completamente o corante. Verificou-se então que a estimativa estava correta, a Figura 32 possibilita visualizar a remoção, corroborada com medições em espectrofotômetro que confirmaram uma remoção de 100% do corante.

Figura 32: Remoção do corante utilizando diferentes concentrações de ramnolipídios, da esquerda para a direita as concentrações utilizadas foram: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25 e 2,12 mg/ml de ramnolipídios

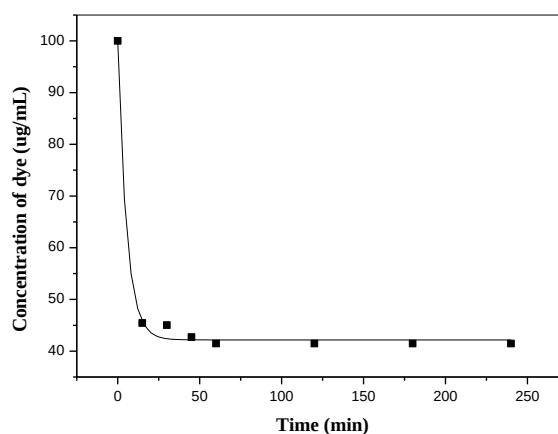


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3.2 Cinética e equilíbrio

Os resultados do estudo cinético mostraram que a adsorção do corante pelos ramnolipídios alcança o equilíbrio em 60 minutos, mantendo o valor de $q_{e(exp)}$ constante, como mostrado na Figura 33, em um processo de tratamento de efluentes o tempo de retenção é importante, pois afeta a eficiência do mesmo (Kuai et al. 1999).

Figura 33: Gráfico do estudo cinético da remoção do corante Direct Orange 2GL utilizando ramnolipídios como adsorvente.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Alguns modelos cinéticos são utilizados para compreender o comportamento do adsorvente e também para analisar qual o processo controlador da adsorção, podendo assim estimar quais interações podem estar ocorrendo (Aravindhana et al. 2007). Desta forma para uma melhor interpretação dos dados foram utilizados os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.

A Equação 3 representa o modelo de pseudo-primeira ordem descrito por Lagergren, (1898).

Equação 3:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_l \cdot t$$

Onde t é o tempo em minutos, k_l é a constante de adsorção da pseudo-primeira ordem (min^{-1}) e q_t é a quantidade de corante adsorvido ($\mu\text{g}/\text{mg}$). Através da regressão linear do gráfico de $\ln(q_e - q_t)$ vs t é possível determinar os valores de k_l e $q_{e(\text{cal})}$.

O segundo modelo cinético utilizado no presente trabalho, foi o de pseudo-segunda ordem desenvolvido por Ho e McKay. (1998) (Equação 4).

Equação 4:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_s \cdot q_e^2} + \frac{t}{q_e}$$

Em que k_s é a constante da pseudo-segunda ordem ($\text{mg}/\mu\text{g min}$), nesse caso k_s e $q_{e(\text{cal})}$ São calculados pela regressão linear (t/q_t) vs t .

Os resultados, mostrados na Tabela 8, comprovaram que a adsorção é melhor descrita pelo modelo de pseudo-segunda ordem, apresentando um coeficiente de correlação mais próximo de 1. O valor do $qe_{(cal)}$ obtido no modelo de pseudo-segunda ordem também se aproximou mais do valor do $qe_{(exp)}$, confirmando o melhor ajuste ao modelo de pseudo-segunda ordem. Este resultado indica que a adsorção ocorre por interação química de compartilhamento ou troca de elétrons entre o adsorvente e o adsorbato (Nandi et al. 2009).

Tabela 8: Resultado dos estudos de cinética de remoção do corante Direct Orange 2GL utilizando ramnolipídios.

Concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$)	$qe_{(exp)}$ ($\mu\text{g/mg}$)	Pseudo-primeira Ordem			Pseudo-segunda Ordem		
		kl (min^{-1})	$qe_{(cal)}$ ($\mu\text{g/mg}$)	R2	ks ($\text{mg}/\mu\text{g min}$)	$qe_{(cal)}$ ($\mu\text{g/mg}$)	R2
100,00	1,170	0,048	0,399	0,91395	0,828	1,181	0,99976

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

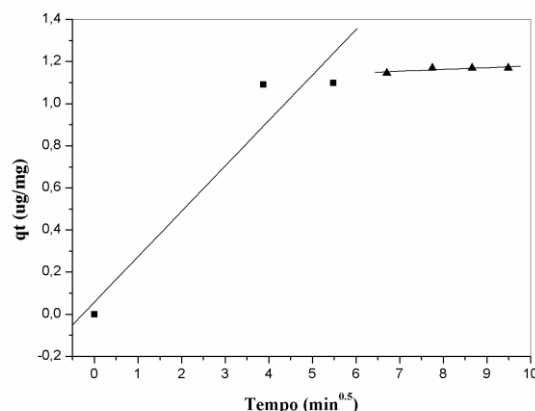
Porém em alguns casos o processo de adsorção não ocorre apenas na superfície externa do adsorvente, podendo ocorrer à penetração do adsorbato, acontecendo assim uma difusão intra-particular. Para analisar a ocorrência desse fenômeno utilizou-se o modelo matemático, mostrado na Equação 5, proposto por Webber e Morris (1963).

Equação 5:

$$qt = Kdi \cdot t^{0,5} + C$$

Onde C é a Constante relacionada a dureza das camadas de difusão ($\mu\text{g}/\text{mg}$), K_{di} é a constante de difusão intraparticular ($\text{mg}/\mu\text{g min}^{0.5}$). Para determinar os valores de K_{di} e C , um gráfico de qt X $t^{0.5}$ foi preparado como pode-se observar na Figura 34.

Figura 34: Difusão intra-particular.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Pode-se visualizar existência de duas regiões lineares no gráfico de difusão intra-particular. A primeira região linear é usualmente associada com transferência externa de massa, enquanto a segunda parte indica a difusão intra-particular em estruturas contendo macro poros (SUTEU et al., 2013). Desta forma, é possível afirmar que está ocorrendo uma difusão intra-partícula do corante em estruturas formadas pelos ramnolipídios. Os autores Ishigami e Suzuki, (1997) relataram que as estruturas formadas pelos ramnolipídios variam de acordo com o pH, quando em meio ácido esse biossurfactante tende a formar vesículas, porém em pH acima de 6,8 esse metabolito microbiano deixa de formar vesícula e passa a formar micelas. Isso corrobora com os resultados obtidos em nosso trabalho, uma vez que a difusão intra-partícula pode ocorrer na presença das vesículas, isso indica ainda que as vesículas junto com a protonação das moléculas de

ramnolipídios favorecem a adsorção, o que não ocorre quando o biotensoativo está na forma de micelas, nas condições avaliadas no presente estudo.

Porém é possível que um comportamento diferente seja apresentado em meio hidrofóbico, quando aconteceria a formação de uma micela reversa, ou mesmo em meio aquoso na presença de um corante hidrofóbico que seria encapsulado pelas micelas, essas hipóteses podem ser suportadas pelo trabalho realizado por Pornsunthorntawee et al, (2009) que utilizaram sudan III um corante hidrofóbico, para demonstrar a eficiência do encapsulamento das vesículas formadas por esse biossurfactante. Nesse caso, o pH da solução aquosa foi de 7,4 favorecendo a formação das micelas que conseguiram encapsular o corante hidrofóbico.

Outro fator perceptível é que os ramnolipídios só alcança o equilíbrio quando ocorre a sorção do corante na sua camada de macro poro.

Ao analisar os dados obtidos na primeira região da regressão linear ($R^2 = 0.96031$, $Kdi = 0.21563 \mu\text{g}/\text{mg min}^{0.5}$, $C = 0.05804 \mu\text{g}/\text{mg}$) e na segunda região ($R^2 = 0.80392$, $Kdi = 0.0084 \mu\text{g}/\text{mg min}^{0.5}$, $C = 1.09525 \mu\text{g}/\text{mg}$), pode-se verificar que a camada externa apresenta uma menor resistência a difusão do corante quando comparado com a camada interna, já que os valores de C da camada externa são menores. A camada mais externa apresentou também valores de Kdi maiores, indicando que seus sítios de ligação são preenchidos mais rapidamente que os sítios de ligação da camada interna.

A

Equação 6, descrita por Boyd et al, (1947), determina se o processo de difusão intrapartícula irá ocorrer primeiro na camada externa para em seguida preencher a camada interna, ou se ocorre primeiro a penetração do adsorbato na camada interna para em seguida preencher a camada externa.

Equação 6:

$$Bt = -0,4977 - \ln(1 - F)$$

e

$$F = \frac{qt}{qe}$$

F é a fração de soluto adsorvida em qualquer tempo t , Bt é a função matemática de F . Se uma linha representando $Bt \times t$ for plotada no gráfico e não passar pela origem isso significa que a sorção é controlada por difusão superficial (Aravindhan et al. 2007).

Apesar de apresentar um coeficiente de regressão $R^2 = 0,93053$, A linha não passa pela origem, confirmando que a difusão ocorre primeiro na camada externa e posteriormente na interna. Este resultado está de acordo com os valores de C e K_{di} obtidos na equação anterior, além de indicar também que o principal sítio de ligação dos Ramnolipídios ao corante está presente nas suas camadas externas, sendo elas controladoras do processo de difusão.

5.3.2.1 Estudos de equilíbrio

O equilíbrio da adsorção é estabelecido quando a quantidade de soluto adsorvida for igual a quantidade de soluto liberada pelo adsorvente, nesse ponto de equilíbrio a concentração em solução permanece constante (ARAVINDHAN et al., 2007). Os estudos do equilíbrio de adsorção auxiliam também na determinação dos possíveis mecanismos de interação, estabelecendo se a adsorção é um processo químico ou físico, além de

indicar afinidade entre o adsorbato/adsorvente. No presente estudo foi usado o modelo de Langmuir e Freundlich isotherm model para analisar os dados de equilíbrio.

O modelo de Langmuir (1918), Equação 7, assume que a adsorção ocorre na superfície do adsorvente de maneira homogênea, formando monocamadas, não apresentando interações laterais em sua superfície, como é relatado por Khandanlou et al, (2015).

Equação 7:

$$\frac{Ce}{qe} = \frac{1}{l \cdot qm} + \frac{Ce}{qm}$$

Onde l é a constante de Langmuir relacionada a afinidade entre o adsorvente e o adsorbato (mL/mg), qm é a máxima quantidade de adsorbato adsorvida a monocamada (µg/mg). O gráfico de (Ce/q) vs Ce é usado para determinar os valores de l e qm .

Na Equação 8, proposta por McKay et al, (1982), foi utilizado o fator de separação do modelo de Langmuir.

Equação 8:

$$Rl = \frac{1}{1 + l \cdot Ce}$$

Rl é o factor de separação da constante de Langmuir. Se $Rl = 0$ a adsorção é irreversível, caso $Rl = 1$ linear, $Rl > 1$ desfavorável, e $0 < Rl < 1$ favorável (MCKAY et al., 1982).

O segundo modelo utilizado, (Equação 9) foi proposto por Freundlich (1906). No modelo de Freundlich, os locais mais energéticos são ocupados principalmente como ou quando a intensidade das interações diminui com o aumento progressivo da ocupação dos

sítios de sorção (YOUSEF et al., 2011). Desta forma, o modelo supõe que a sorção ocorre em sítios heterogêneos, sendo ocupados de forma exponencial, formando múltiplas camadas.

Equação 9:

$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n_f} \cdot \ln C_e$$

Onde n_f é a intensidade constante de adsorção, e K_f é a constante de Freundlich que representa a capacidade de adsorção (ml / mg).

Os resultados das isotermas, (Tabela 9) mostraram que em todas as temperaturas a adsorção se ajustaram melhor ao modelo de Langmuir, indicando a interação do corante com um sítio específico dos ramnolipídios, formando monocamadas. A isoterma de Langmuir é muito utilizada em processos de adsorção de proteínas e lipídeos em uma superfície, interface ou membranas (CHEN ; HUANG., 2004).

Tabela 9: Resultado dos parâmetros de isotermas

Temperatura (K)	Isoterma de Langmuir				Isoterma de Freundlich		
	R_l	q_m	l	R^2	K_f	N_f	R^2
283,15	0,011	1,135	0,849	0,98687	0,903	19,864	0,85027
293,15	0,009	1,187	1,017	0,99075	0,907	18,667	0,86722
303,15	0,041	1,129	0,229	0,99090	3,810	3,743	0,91733
313,15	0,031	1,446	0,306	0,99855	0,927	10,186	0,88273

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os valores de qm ficaram muito próximos, com exceção durante a adsorção á 313.15 K, onde se obteve um valor maior em comparação aos demais. Isso pode ser um indicativo que o aumento de temperatura influencia na adsorção, aumentando a eficiência dos ramnolipídios em adsorver o corante. O valor do qm também ficou próximo do valor obtido do $qe_{(exp)}$ no modelo cinético de pseudo-segunda ordem, confirmando que o equilíbrio só é alcançado quando todos os sítios específicos de interação são ocupados. No modelo de Langmuir apenas uma espécie química do adsorbato pode se ligar ao adsorvente, apenas quando todos os sítios finitos são preenchidos o adsorvente entra no equilíbrio (PODKOSCIELNY ; NIESZPOREK., 2011).

Os valores de Rl indicaram também que a adsorção do corante Direct Orange 2GL por esse biossurfactante é favorável em todas as temperaturas.

Ao analisar os dados obtidos na isoterma de Frenlich é possível ver que os valores de Kf foram baixos, sendo quase todos inferiores a zero, não apresentando assim uma alta constante de multicamadas, indicando que o adsorvente não apresenta uma interação ilimitada como é descrito no modelo de Frenlich (ADANE et al., 2015). Os valores de nf superiores a 1 mostram um aumento de energia livre durante a adsorção, indicando uma forte interação entre adsorbato/adsorvente, além de ser um indicador que a isoterma é convexa (ADANE et al., 2015).

Para determinar se a adsorção é realmente influenciada pela temperatura realizou-se um estudo termodinâmico, utilizando a (

Equação 10) proposta por Van't Hoff. Os estudos termodinâmicos são importantes também para determinar se o processo de adsorção é endotérmico ou exotérmico, e se ele é espontâneo (FAT'HI et al., 2014).

Equação 10:

$$\ln Kts = \frac{\Delta s}{Rg} - \frac{\Delta H}{Rg} \cdot \frac{1}{T}$$

e

$$Kts = \frac{qe}{Ce}$$

Em que T é a temperatura (K), Rg é a constante de gás Universal (8,314 J / mol K), KTS é a constante de equilíbrio obtida durante a variação de temperatura (mol / g), Ds é entropia, e ΔH representa a entalpia.

Com um gráfico de $\ln Kts \times (1 / T)$ é possível determinar os valores de entropia e entalpia, usando os dados obtidos da inclinação e intersecção. Usando os dados de entropia e entalpia, com a Equação 11, foi possível calcular a energia livre de Gibbs (ΔG).

Equação 11:

$$\Delta G = \Delta H - (\Delta S.T)$$

Os valores do ΔG diminuem conforme a temperatura aumenta como visto na Tabela 10, esses resultados confirmam que o processo de adsorção é influenciado pela temperatura, sendo que conforme a temperatura aumenta a adsorção do corante Direct Orange 2GL pelos ramnolipídios se torna mais eficiente. Os valores negativos de ΔG , também confirmam que a adsorção é espontânea e termodinamicamente favorável (SABER-SAMANDARI ; HEYDARIPOUR., 2015).

Tabela 10: Resultados dos estudos de termodinâmica.

Temperatura(K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
	15,450	0,080	
283,15			-7,202
293,15			-8,002
303,15			-8,802
313,15			-9,602

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os valores positivos de ΔH confirmam que a adsorção é um processo endotérmico. Os valores positivos de ΔS indicam um aumento na concentração do adsorbato sobre a fase sólida na interface de sólido-liquido, pode estar ocorrendo uma aleatoriedade durante a adsorção (FAT'HI et al., 2014). Esse tipo de resultado pode significar que está ocorrendo uma adsorção física favorável por pontes de hidrogênio. O pH ácido tende a aumentar a ocorrência de pontes de hidrogênio durante um processo adsorção (ARAUJO et al., 2006).

5.3.3 Recuperação do corante após a adsorção

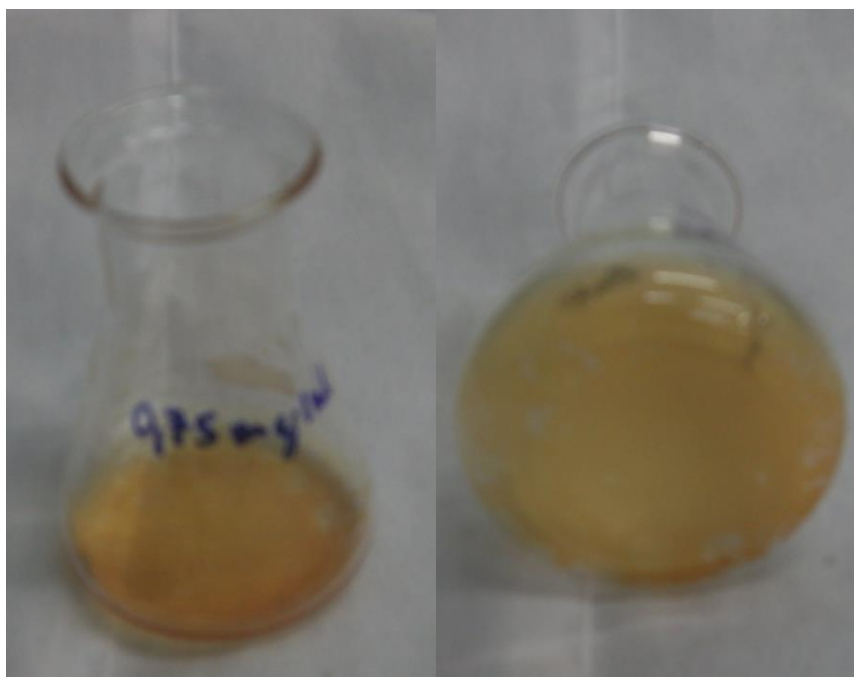
O total da porcentagem de corante ligado aos ramnolipídios antes do teste de recuperação do corante foi de 50.05%. O ajuste de pH foi realizado observando a

dissociação do corante do biossurfactante precipitado. Quando todo o ramnolipídios estava completamente dissociado do corante, o pH da solução era 7.40.

Ao realizar a análise no espectro fotômetro UV-Vis do corante recém-separado, foi estipulado que 67,69% do corante que estava adsorvido ao biossurfactante foi recuperado. Esse é um indicativo que a interação entre o esse metabólito microbiano e o corante se dá através de ligações químicas reversíveis, além de confirmar os resultados do *Rl* obtidos na isoterma de Langmuir, que a adsorção é favorável.

A Figura 35 ilustra o corante adsorvido ao biossurfactante e precipitado no fundo do frasco antes da tentativa de recuperação do corante.

Figura 35: Corante adsorvido aos ramnolipídios e precipitado antes do teste de recuperação do corante (dessorção)



Apesar de não recuperar 100% do Material, uma recuperação do adsorvente de mais de 50% é um resultado positivo, podendo reutilizar tanto o adsorvente como o próprio corante mais uma vez. A recuperação do corante, bem como a reutilização de um

material adsorvente é muito vantajosa para um processo de tratamento industrial, aproveitando ao máximo seu resíduo e reciclando o seu material de tratamento (MITTAL et al., 2009). O desligamento do corante e do adsorvente também se mostrou um processo simples, baseado apenas na alteração de o pH, que foi elevado para uma faixa neutra. A simplicidade da técnica de separação também facilita sua aplicação em tratamentos industriais (MITTAL et al., 2009).

A Figura 36 mostra o corante e o biossurfactante já desadsorvido, possibilitando a visualização de que seria possível a reutilização do corante após a concentração causada pela adsorção.

Figura 36: corante e desadsorvido do biossurfactante após processo de alcalinização do pH.

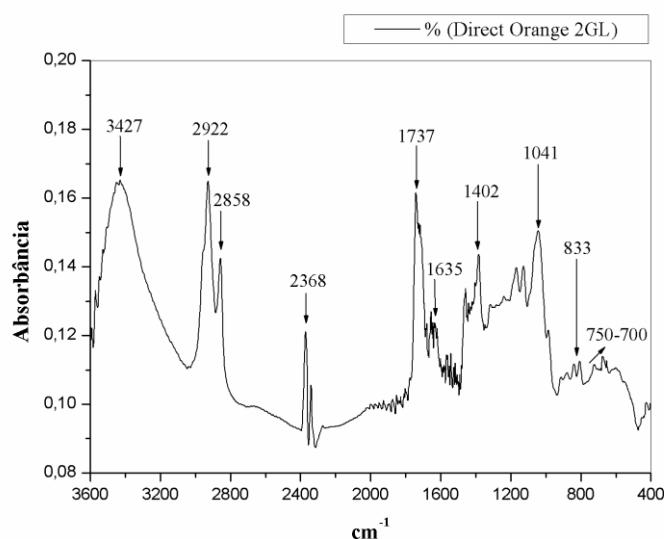


5.3.4 Análise em FT-IR

O espectro do corante, (Figura 37), revelou uma banda intensa na região 1737 cm^{-1} , essa região é referentes a ligações =C-C em compostos aromáticos. Outras bandas que se destacaram foram nas regiões 1402 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} , que é a ligação de grupos

sulfônicos SO_3 e ligação com grupos amina. A região 1635 cm^{-1} mostra o estiramento da ligação de $-\text{NH}_2$. As bandas de $750\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ revelam também ligações de $-\text{CH}_2$ e ligações de $\text{N}-\text{C}-$. A banda 833 cm^{-1} mostra o estiramento da ligação de $-\text{C}-\text{H}$ em anéis aromáticos.

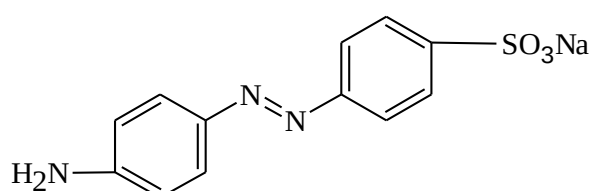
Figura 37: Espectro do corante Direct Orange 2GL antes da adsorção.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Todos os picos do espectro e as bandas analisadas correspondem à molécula de corante mostrada na Figura 38. As bandas 3427 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} , 2858 cm^{-1} , e 2368 cm^{-1} são referente a aminas livres, grupos funcionais CH_2 e resíduo de CO_2 do ambiente.

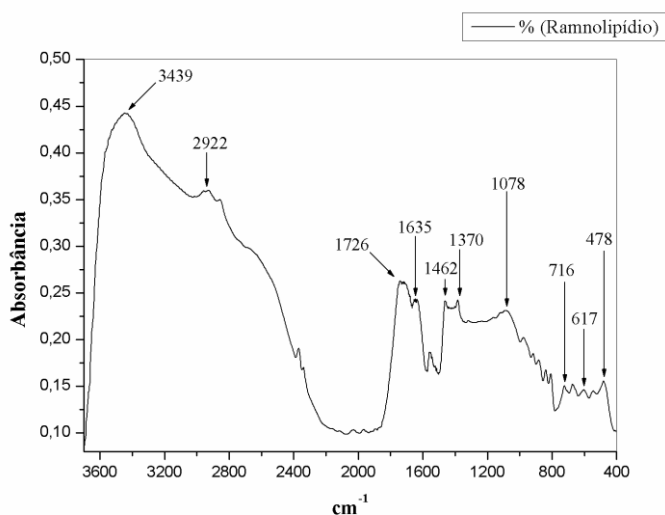
Figura 38: Estrutura química do corante Direct Orange 2GL.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O espectro dos ramnolipídios, (Figura 39) mostrou bandas nas regiões 478 e 716 cm^{-1} sendo este um indicativo de ligações de $\text{H}-\text{C}-\text{C}$ e ligações $-\text{CH}_3$. A banda 617 cm^{-1} representa o estiramento de uma cadeia de ligação entre carbonos, como $-\text{CH}_R-\text{CH}_2-\text{CH}_R$, sendo está uma cadeia bastante presente nos ramnolipídios, podendo ser encontrada facilmente na cadeia desse glicolipídio. As bandas 1078 e 1462 cm^{-1} representam ligações de $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{C}$, e $\text{C}-\text{OH}$ em cadeias cíclicas, sendo comum estás ligações na cabeça estrutural polar dos ramnolipídios. O pico 1635 cm^{-1} mostra o estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$. As bandas mais intensas nas regiões 2922 e 3439 cm^{-1} mostram vibrações da ligação $-\text{CH}_2$ e deformações em ligações $-\text{C}-\text{OH}$, sendo estás as principais ligações presentes na estrutura do biossurfactante utilizado.

Figura 39:Espectro dos ramnolipídios antes da adsorção.



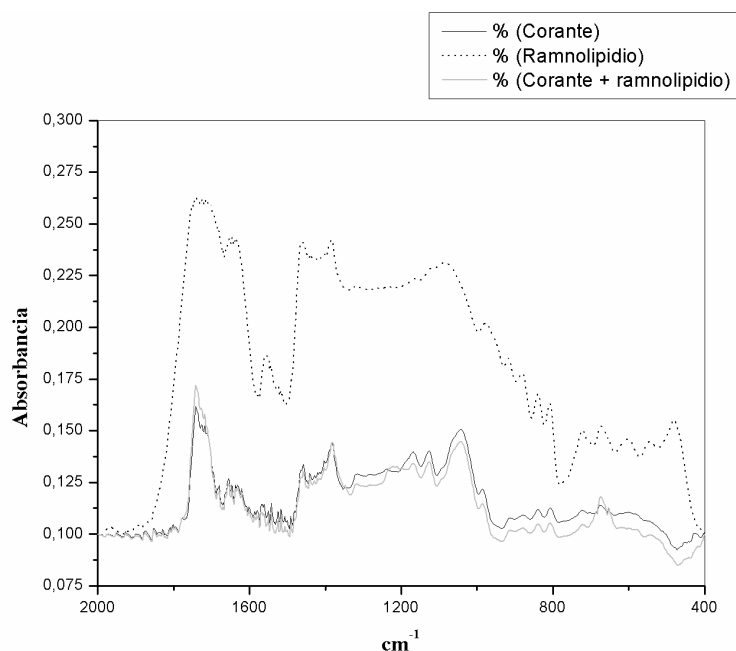
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As bandas 1370 e 1726 cm^{-1} indicam a presença de grupos sulfônicos e aminas livres, provavelmente este é um resíduo que ficou presente no adsorvente mesmo após a sua purificação.

Os ramnolipídios vem sendo estudados a bastante tempo e sua estrutura está bem elucidada, eles são reportados como uma mistura de espécies homólogas de RL1 (Rha2C10C10), RL2 (RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) e RL4 (RhaC10) (LANG e WAGNER, 1987). Sendo então sua estrutura básica uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas cadeias lipídicas (exemplo: RHA-Rha-C10-C10) (NITSCHKE et al, 2005b; SOBERON-CHAVEZ et al, 2005; MULLIGAN, 2005). O FT-IR foi uma boa ferramenta para caracterização esse biossurfactante, identificando seus principais sítios de ligação, confirmando suas principais estruturas químicas.

O espectrofotômetro FT-IR é uma ferramenta útil na identificação de possíveis sítios de ligação durante uma adsorção, além de confirmar se o processo é físico ou químico (MONASH ; PUGAZHENTHI., 2009). Desta forma ao comparar o espectro do corante antes e após a adsorção pelos ramnolipídios é possível ver certas alterações em suas bandas, como mostrado na Figura 40.

Figura 40: Espectro do corante antes e depois da adsorção utilizando ramnolipídios.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

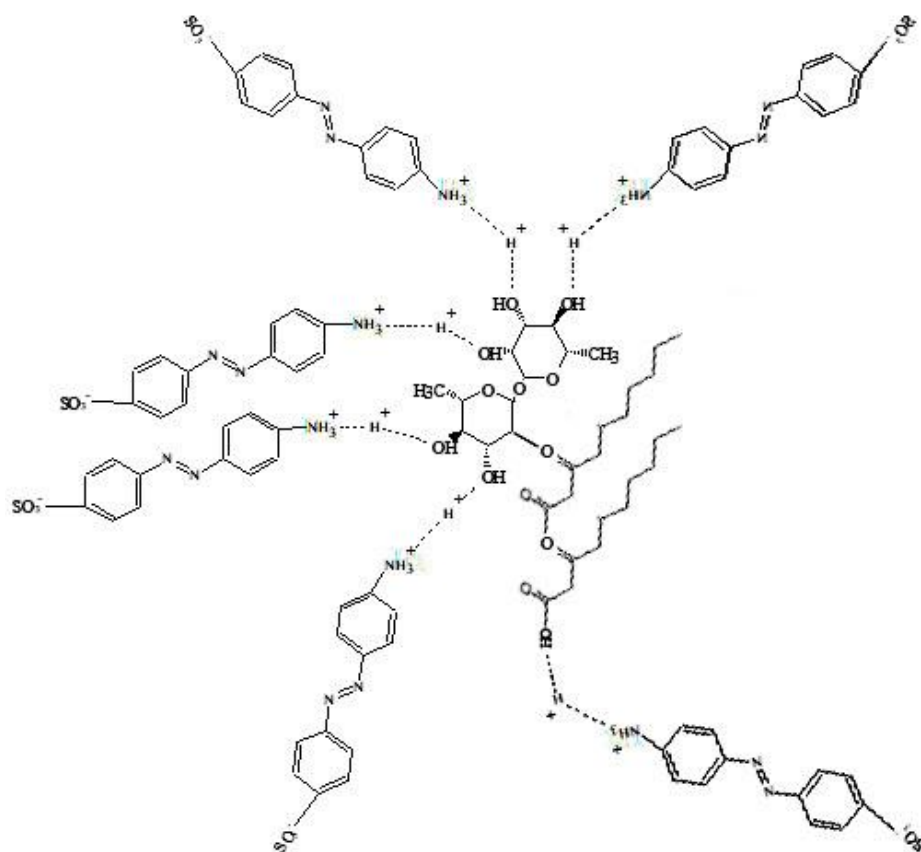
O espectro do corante após a adsorção apresentou uma alta intensificação na banda 1737 cm^{-1} que representa ligações =C-C em compostos aromáticos. A intensificação de uma banda específica após um processo adsorptivo pode ser um indicativo do aumento da concentração do composto alvo, nesse caso o corante, como descrito por Monash e Pugazhenth, (2009).

Pode-se afirmar desta forma que o biossurfactante está realmente adsorvendo o corante concentrando-o em sua superfície. É possível observar uma deformação na banda 1314 cm^{-1} , sendo esta uma vibração de grupos -SO_3^- , presentes no corante quando este está dissolvido na água, liberando o Na^+ , ficando eletricamente negativo. Os grupos -SO_3^- são os principais pontos de formação de pontes de hidrogênio próximos aos grupos -OH^+ , principalmente quando a solução está protonada em um pH ácido (Mendes et al. 2015). Outra deformação e intensificação é observada no pico 670 cm^{-1} , que representa o

estiramento de ligações -NH_2 . O -NH_2 quando está em um meio protonado tende a formar o grupo químico -NH_3^+ , apresentando assim a tendência de realizar pontes de hidrogênio com grupos -OH^+ (MENDES et al., 2015).

A banda 1214 cm^{-1} mostra a vibração da ligação de -C-O^- , indicando uma deformação nesta região, provavelmente deve estar ocorrendo uma ligação química de compartilhamento de elétrons entre os ramnolipídios e o corante. A alteração do espectro de FT-IR em uma adsorção é um indicativo da ocorrência de quimiossorção, onde o adsorbato interage quimicamente com o adsorvente (NGAH et al., 2006). A Figura 41 mostra o desenho esquemático das possíveis interações químicas observadas através do espectrofotômetro FT-IR entre o corante Direct Orange 2GL e uma molécula de ramnolipídios.

Figura 41: Possíveis interações entre o corante Direct Orange 2GL e uma molécula de ramnolipídios.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como mostrado na Figura 41 a maior parte da ligação entre o corante e os ramnolipídios se dá provavelmente por pontes de hidrogênio, sendo formadas pela interação dos grupos OH presente na ramnose desse biossurfactante com os grupos NH_3^+ do corante. A formação dessas pontes de hidrogênio só é possível em um meio ácido, confirmando assim as análises iniciais quanto a adsorção em diferentes faixas de pH, onde apenas em pHs ácidos a partir de 4.00 foi possível verificar uma remoção

eficiente do corante. Esse resultado corrobora também com o teste de recuperação de corante, onde apenas elevando o pH para a faixa do neutro foi possível recuperar o corante, podendo afirmar que as pontes de hidrogênio feitas entre os ramnolipídios e o corante foram dissociadas.

A ligação entre o grupo $\text{C}-\text{O}^-$ dos ramnolipídios com o grupo $-\text{NH}_3^+$ do corante é formada pelo compartilhamento de elétrons, apresentando assim uma característica de quimiossorção, corroborando com os dados obtidos nos modelos matemáticos de cinética e isoterma onde houve a indicação da ocorrência desse fenômeno. Esse dado também confirma uma forte interação entre adsorbato/adsorvente, confirmando assim os resultados obtidos na termodinâmica. Por ser uma ligação química forte ela deve ser também a responsável pela não dissociação completa entre o corante e o adsorvente durante o teste de recuperação de amostra. Pode-se afirmar também que o espectrofotômetro FT-IR ajudou a comprovar os resultados obtidos nos modelos de cinética, isoterma e termodinâmica, sendo uma ferramenta eficiente em estudos adsorptivos.

5.3.4.1 Teste de toxicidade utilizando *Daphnia similis*.

O crustáceo *Daphnia similis* apresentou uma alta sensibilidade ao corante Direct Orange 2GL, sendo que a população de crustáceo era afetada conforme aumentava a concentração do corante. A *Daphnia* é um bom bioindicador para corantes, sendo fácil de realizar seu bioensaio, além de apresentar resultados satisfatórios quanto à toxicidade da solução testada (Immich et al. 2009).

Os resultados mostraram que com uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ todas as *Daphnia similis* morriam, sendo está a concentração do LC_{100} . O LC_{50} foi alcançado com

uma concentração de 100 µg/mL, onde metade da população ainda estava viva na presença do corante. Os resultados da toxicidade da solução após a adsorção pelos ramnolipídios são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores do teste de toxicidade com *Daphnia similis* antes e depois da adsorção.

	Concentração do corante antes da adsorção (LC ₅₀) (µg/mL)	Concentração do corante após a adsorção (µg/mL)	Mortalidade (%)
Controle	100,00	100,00	50
0,25 mg/mL of Ramnolipídios	100,00	84,100	46
0,50 mg/mL of RHLP	100,00	72,311	42
0,75 mg/mL of Ramnolipídios	100,00	61,090	38
1,00 mg/mL of Ramnolipídios	100,00	49,005	34
1,25 mg/mL of Ramnolipídios	100,00	25,603	26

É possível verificar que a taxa de mortalidade das *Daphnia similis* fica próximo á 30% após a remoção do corante, sendo que a concentração residual fica abaixo de 50% da LC₅₀, utilizando neste caso 1,00 mg/mL de ramnolipídios. Nas concentrações 0,25,

0,50 e 0,75 mg/mL de biossurfactante conseguiu-se remover uma quantidade satisfatória do corante, porém a toxicidade ainda ficou próxima de 40%. Apenas a diminuição da coloração de um efluente contaminado com corante têxtil não é suficiente, podendo continuar tóxico mesmo com baixa concentração do corante, apresentando assim um perigo para o meio ambiente (Contreras et al. 2012). Esses resultados confirmam a alta toxicidade do corante Direct Orange 2GL.

O melhor resultado só é alcançado quando utilizou-se 1,25 mg/mL de ramnolipídios, reduzindo praticamente a metade da toxicidade da solução de corante, alcançando uma taxa de mortalidade de apenas 26%. Como a redução da mortalidade das *Daphnia similis* é proporcional à remoção do corante, pode se estipular que se aumentar a concentração de ramnolipídios até que todo o corante fosse removido possibilitaria a redução da mortalidade das *Daphnia similis*. Desta forma pode-se sugerir que os ramnolipídios foram eficientes na remoção do corante Direct Orange 2GL, e na diminuição da toxicidade da solução após o tratamento.

5.4 CONCLUSÃO

Os ramnolipídios apresentaram-se uma boa ferramenta para a remoção do corante Direct Orange 2GL em pHs ácidos, além do processo de adsorção desse corante utilizando esse metabólito microbiano atingir o equilíbrio rapidamente, isso aliado ao fato de que a remoção do corante foi realizada por adsorção de toda a molécula, não apresentando quebras no corante apenas removendo o mesmo da fase aquosa, possibilitou uma redução da toxicidade da solução, dessa maneira os ramnolipídios que são moléculas verdes e apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade podem então ser uma boa solução para tratamento do efluente de indústrias têxteis, removendo o corante desses efluentes, além disso é possível ainda concentrar o corante removido por essa biomolécula, e reverter a adsorção, permitindo um reaproveitamento do corante.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABDEL-MAWGOUD, M. A.; LEPINE, F.; DEZIEL E. A Stereospecific Pathway Diverts β -Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants **Chemistry & Biology** v.21 p.156–164, 2014.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnol. Letters**, Dordrecht, v. 22, p. 313-316, 2000.

ADANE B, SIRAJ K, MEKA N. Kinetic, equilibrium and thermodynamic study of 2-chlorophenol adsorption onto *Ricinus communis* pericarp activated carbon from aqueous solutions. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v.8, p 1-12, 2015.

AGHAJANI, M.; RAHIMPOUR, A.; AMANI, H.; TAHERZADEH, M. J. Rhamnolipid as new bio-agent for cleaning of ultrafiltration membrane fouled by whey **In Eng. Life Sci.**, v.18, p. 272–280, 2018.

AGUIRRE-RAMÍREZ, M., MEDINA, G., GONZÁLEZ-VALDEZ, A., GROSSO-BECERRA, V., SOBERÓN-CHÁVEZ, G. 2012. The *Pseudomonas aeruginosa*

rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σ_s .

Microbiology v.158, p. 908–916, 2012.

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

ARA, I.; MULLIGAN, C. N. Conversion of Cr(VI) in water and soil using rhamnolipid. 61. St Canadian Geotechnical Conference, Edmonton, Sept. 20-24, 2008.

ARAUJO, J. C., ASSIS, J. T., MONINE, V. I., & BERTOLINO, L. C. Characterization of kaolinite microstructure by X ray diffraction. *Materia (Rio de Janeiro)* v.11 p. 361-371, 2006.

ARAVINDHAN, R., RAO, J. R., & NAIR, B. U. Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green algae *Caulerpa scalpelliformis*. **Journal of Hazardous Materials**, v.142 p. 68-76, 2007

ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Appl. Environ. Microbiol**, 45, 162-168, 1996

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

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

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

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Anton. Leeuw. Int. J. G**, v.85, p.1-8, 2004.

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

BLANK, L. M.; KUEPFER, L. Metabolic flux distributions: Genetic information, computational predictions, and experimental validation, **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.86, p.1243-55, 2010.

BOYD, G. E., ADAMSON, A. W., E MYERS, L. S. The exchange adsorption of ions from aqueous solution by organic zeolites, II. Kinetics, Journal of the **American Chemical Society**, v.69, p.2836-2848, 1947.

BRUNELLI, T. F. T.; GUARALDO, T. T.; PASCHOAL, F. M. M.; ZANONI, M. V. B. Degradação fotoeletroquímica de corantes dispersos em efluente têxtil utilizando fotoanodos de Ti/TiO₂. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 67-71, 2009.

BUCHHOLZ T, FRIEDLAND AJ, HORNIG CE, KEETON WS, ZANCHI G, NUNERY J Mineral soil carbon fluxes in forests and implications for carbon balance assessments. GCB Bioenergy. doi:10.1111/gcbb.12044, 2013.

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

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

CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A. D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene Encodes NADPH-dependent β -ketoacyl Reductase Which is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n. 17, p. 4442 – 4451, 1998.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. *The Color*. 2 ed. Elsevier **Academic Press**: London, 588 p., 2004.

CERESANA MARKETING RESEARCH, <https://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/surfactants>: acesso em 21 de Dezembro de 2018.

CHEN DH; HUANG, SH Fast separation of bromelain by polyacrylic acid- bound iron oxide magnetic nanoparticles. **Process Biochemistry** v.39, p.2207–2211, 2004.

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

CONTRERAS E., SEPULVEDA L., PALMA C. (2012) Valorization of Agro-industrial Wastes as Biosorbent for the Removal of Textile Dyes from Aqueous Solutions. **International Journal of Chemical Engineering**, 2012, 9.

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

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Proc. Biochem**, v. 41, p.483–488, 2006.

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.

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

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

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

DÉZIEL, 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. rhlA 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, 2003.

FATHI, M. R., ASFARAM, A., HADIPOUR, A., & ROOSTA, M. Kinetics and thermodynamics studies for removal of Acid Blue 129 from aqueous solution by almond shell. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v.12, p. 62, 2014.

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

FILLOUX, A.. RAMOS, J. *Pseudomonas* Methods and Protocols **Springer**, v.5, 2007.

Frank, D. W. *Pseudomonas aeruginosa*, Biology, genetics, and Host-pathogen Interactions **Frontiers in Microbiology**, 2012.

FREUNDLICH, H. Adsorption in solution. **Z Phys Chem**, v.40, p.1361-1368, 1906.

FUQUA, W.C.; GREENBERG, E.P. Self perception in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 183 – 189, 1998.

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

GLENN JK, GOLD MH Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied and Environmental Microbiology** v.45 p.1741-1747, 1983.

GOMBERT, A.K.; NIELSEN, J. Mathematical modeling of metabolism. **Curr. Opin Biotechnol.**, v. 11, p. 180-186, 2000.

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.

GONG, R.; ZHANG, X.; LIU, H.; SUN, Y.; LIU, B. Uptake of cationic dyes from aqueous solution by biosorption onto granular kohlrabi peel. **Bioresource Technology**, V. 98, p. 1319-1323, 2007.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Revista Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-79, 2000.

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

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

.

HO, Y. S., MCKAY, G. Sorption of dye from aqueous solution by peat. **Chemical Engineering Journal**, v.70, p.115-124, 1998.

HOSSEINI, S. D.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Decomposition and discoloration of synthetic dyes using hot/liquid (subcritical) water. **Water Research**, v. 44, p. 1900-1908, 2010.

IMMICH APS, SOUZA AAU, GUELLI SMA, SOUZA U. Removal of Remazol Blue RR dye from aqueous solutions with Neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna*. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p.1580-1585 2009.

ISHIGAMI, Y.; SUZUKI, S. Development of biochimecalsfunctionalization of biosurfactants and natural dye. **Progress in Organic Coatings**, v.31, p.51–61, 1997.

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

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

JESUS, G. J. *Utilização de Neurospora crassa 74A para a avaliação da bioissorção e biodegradação dos corantes ácidos, xanteno, direto e reativo*. 2005. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas na Área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TÜMMER, B. Quorum-sensing: the power of cooperation in the world of pseudomonas. **Environ. Microbiol.** v.7, p.459–471, 2005.

KADIRVELU, K.; KAVIPRYA, M.; KARTHIKA, C.; RADHIKA, M.; VENNILAMINI, N.; PATTABHI, S. Utilization of various agricultural wastes for activated carbon preparation and application for the removal of dyes and metal ions from aqueous solutions. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 1, p. 129-132, 2003.

KHANDANLOU R, AHMAD MB, FARD MASOUMI HR, SHAMELI K, BASRI M, KALANTARI K. Rapid Adsorption of Copper(II) and Lead(II) by Rice Straw/Fe₃O₄ Nanocomposite: Optimization, Equilibrium Isotherms, and Adsorption Kinetics Study. **PLoS ONE** 10(3): e0120264, 2015.

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

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

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

KLOCKGETHER, J.; MUNDER A.; NEUGEBAUER, J.; DAVENPORT, C. F.; STANKE, F.; LARBIG, K. D.; HEEB, S.; SCHOCK, U.; POHL, T. M.; WIEHLMANN, L.; TUMMLER, B. Genome Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Laboratory Strains **journal of bacteriology**, p. 1113–1121, 2010.

KRÖMER, J. O.; NIELSEN, L. K.; BLANK, L. M. Metabolic Flux Analysis: Methods and Protocols: 1^a ed. 2014.

KUAI L, KERSTENS W, CUONG NP, VERSTRAETE W. Treatment of domestic wastewater by enhanced primary decantation and subsequent naturally ventilated trickling filtration, **Water, Air and Soil Pollution** v.113: p.43-62, 1999.

KUHN D, BLANK LM, SCHMID A, BUHLER B. Systems biotechnology—rational whole-cell biocatalyst and bioprocess design. **Eng. Life Sci.**, v. 10, p.384–397, 2010.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p.78-82, 2002.

LAGERGREN S Zurtheorie der sogenannten adsorption gel osterstoffe. Kung-liga Svenska Vetenskapsakademiens, Handlingar v24: p.1–39, 1898.

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

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

LANGMUIR, I.. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, 40, 1361-1368, 1918.

LATIFI, A.; FOGLINO, M.; TANAKA, K.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. **Mol Microbiol**. v.21 p.:1137-46, 1996.

LEVANDOWSKI, J.; KALKREUTH, W. Chemical and petrographical characterization of feed coal, fly ash and bottom ash from the Figueira power plant. **International Journal of Coal Geology**, v. 77, p. 269-281, 2009.

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

LIU, G.; ZHONG, H.; YANG, X.; LIU, Y.; SHAO, B.; LIU, Z. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review **Biotechnology and Bioengineering**. V.115, p. 796–814, 2017.

LOVAGLIO R. B.; COSTA, S.S.G.V.A.O.; GONÇALVES, L. A.G.; CONTIERO, J. Effect of C/N Ratio and Physicochemical Conditions on the Production of Rhamnolipids

by *Pseudomonas aeruginosa* LBI **Libyan Agriculture Research Center Journal International** v.1 p.85-92, 2010.

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

LOVAGLIO, R. B. Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI **Tese de Doutorado, depositada na biblioteca virtual da UNESP**, 2011.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 58, 428-434, 2002.

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

MARCELINO, P. R. F.; SILVA, V. L.; PHILIPPINI, R. R.; VON-ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases **Plos one**, 2017.

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

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

MARTINEZ-GARCIA, E.; DE LORENZO, V. Engineering multiple genomic deletions in gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. **Environ. Microbiol.** v.13, p.2702–2716, 2011.

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

MCKAY, G., BLAIR, H. S., & GARDNER, J. R. Adsorption of dyes on chitin: Equilibrium studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v.27, p.3043-3043, 1982.

MENDES CR, DILARRI G, PELEGRINI RT. Application of biomass *Saccharomyces cerevisiae* as adsorption agent of dye Direct Orange 2GL and possible interactions mechanisms adsorbate/adsorbent. *Materia* (Rio de Janeiro), v.20 p.898-908, 2015.

MITTAL A, MITTAL J, MALVIYA A, GUPTA VK . Adsorptive removal of hazardous anionic dye “Congo red” from wastewater using waste materials and recovery by desorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.340, p.16-26, 2009.

MONASH, P., & PUGAZHENTI, G. Adsorption of Crystal Violet dye from aqueous solution using mesoporous materials synthesized at room temperature. **Adsorption**, v.15, p.390-405, 2009.

MOHAMMAD, A. ABDEL-MAWGOUD; LEPINE, F.; DEZIEL; E., A Stereospecific Pathway Diverts β -Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants **Chemistry & Biology** v.21 p.156–164, 2014.

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

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

MÜLLER, M.M; HAUSMANN, R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. **Appl Microbiol Biotechnol** v.91 p.251 –264, 2011.

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

MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol**, v. 12, p. 199-210, 1989

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

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

NANDI BK, GOSWAMI A, PURKAIT MK. Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin, **Journal of Hazardous Materials** v.161, p. 387-395, 2009.

NGAH, W. S. W., KAMARI, A., FATINATHAN, S., NG, P. W. Adsorption of chromium from aqueous solution using chitosan beads. **Adsorption**, v.12, p.249-257, 2006.

NIELSEN, J. Metabolic Engineering. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, p. 263-283, 2001.

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

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

OBERHARDT, M. A.; PUCHAŁKA, J.; DOS SANTOS, V. A. P. M.; PAPIN, J. A. Reconciliation of Genome-Scale Metabolic Reconstructions for Comparative Systems Analysis **Plos one**, 2011.

OLIVEIRA, A. C. S. M.; BEZERRA, M. S.; PADILHA, C. E. A.; MELCHUNA, A. M.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Recovery of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Using Acidic Precipitation, Extraction, and Adsorption on Activated Carbon Separation **Science and Technology**, v.48 p.2852–2859, 2013.

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.

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

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

PODKOSCIELNY P, NIESZPOREK K. Adsorption of phenols from aqueous solutions: Equilibria, calorimetry and kinetics of adsorption, **Journal of Colloid and Interface Science** v.354 p.282-291, 2011.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJA, S.; RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.72, p.6–15, 2009.

RABELO R, VIEIRA R, LUNA F, GUIBAL E, BEPPU M (2012) Adsorption of copper (II) and mercury (II) ions onto chemically-modified chitosan membranes: equilibrium and kinetics properties, **Adsorption Science and Technology** 30:1-22.

RAHMAN, K.S.M, RAHMAN, T.J, KOURKOUTAS, Y, PETSAS, I, MARCHANT, R, BANAT, I.M., Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology** v.90, p.159–168, 2003.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 18, p. 115-121, 2007.

RIKALOVIC, M. G.; ABDEL-MAWGOUD, A. M.; DÉZIEL, E.; GOJGIC-CVIJOVIC, G. D.; NESTOROVIC, Z.; VRVIC, M. M.; KARADZIC, I. M. Comparative Analysis of

Rhamnolipids from Novel Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Surfact Deterg**. 2013.

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.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

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

ROSSITER, O.; ROCHA, S.; NASCIMENTO, G. E.; CAMPOS, N. F.; SILVA, V. L.; DUARTE, M. M. M. B. Avaliação do processo adsorptivo utilizando mesocarpo de coco verde para remoção do corante cinza reativo BF-2R. **Química Nova**, v. 35, n.7, p. 1369-1374, 2012.

SABER-SAMANDARI, S., HEYDARIPOUR, J. Onion membrane: An efficient adsorbent for decoloring of wastewater. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 13, 16, 2015.

SALMOND, G.P.C.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.A.B.; WILLAMS, P. The bacterial enigma: cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.*, Salem, v. 16, p. 615-624, 1995.

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

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

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

SANTOS, A. S.; JUNIOR, N. P.; FREIRE, D. M. G. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1 *PeerJ* v. 4, 2016.

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, F. M.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S. Adsorção do corante têxtil azul de remazol R por pseudocaule da bananeira (*Musa* sp). **Cadernos de Pesquisa**, v. 17, p. 71-77, 2010a.

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

SILVA, V. L. Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em biorreator **Dissertação de mestrado, depositada na biblioteca virtual da UNESP**, 2014.

SILVA, V.L.; LOVAGLIO, R.B;VONZUBEN, C; CONTIERO, J. Rhamnolipids: solution against *Aedesaegypti*? **Frontiers in microbiology** v.6 2015a.

SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R. B.; TOZZI, H. H.; TAKAKI, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipids: A New Application in Seeds Development **Journal of Medical and Biological Science Research**, v. 1, p. 100-106, 2015b.

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

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

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

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

STEPHANOPOULOS, G.N.ARISTIDOU, A.A.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering principles and Methodologies. **San Diego: Academic Press**, 1998,

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

SUTEU, D., BLAGA, A. C., DIACONU, M., & MALUTAN, T. Biosorption of reactive dye from aqueous media using *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Equilibrium and kinetic study. **Central European Journal of Chemistry**, 11(12), 2048-2057, 2013.

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

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

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

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.

THINAKARAN, N.; PANNEERSELVAM, P.; BASKARALINGAM, P.; ELANGO, D.; SIVANESAN, S. Equilibrium and kinetic studies on the removal of Acid Red 114 from aqueous solutions using activated carbons prepared from seed shells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, n. 1, p. 142-150, 2009.

TISO, T.; SABELHAUS, P.; BEHRENS, B.; WITTGENS, A.; ROSENAU, F.; HAYEN, H.; BLANK, L. M. Creating Metabolic demand as an engineering strategy in *Pseudomonas putida* – Rhamnolipid synthesis as an example. **Metabol. Eng. Comm.**, v. 3, p. 234 – 244, 2016.

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

VARMA, A.; PALSSON, B. O. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. Synthesis of biosynthetic precursors and cofactors. **Journal of Theoretical Biology**. V. 165, p. 477–502, 1993.

VARNIER, A. L.; SANCHEZ, L.; VATSA, P.; BOUDESOCQUE, L.; GARCIA-BRUGGER, A.; RABENOELINA, F.; SOROKIN, A. Renault JH, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieul F, Dorey S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell Environ**, v.32, p.178–193, 2009.

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

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

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

WAGNER, V.E.; FILIATRAULT, M.J.; PICARDO, K.F.; IGLEWSKI, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and pathogenesis issues. in: cornelis, P. *pseudomonas* genomics and molecular biology. **norfolk: caister academic press**, p. 129 – 158, 2008.

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

WANG X, SUN L, WANG H, WU H, CHEN S, ZHENG X.. Surfactant-enhanced bioremediation of DDTs and PAHs in contaminated farmland soil. *Environ Technol*. doi: 10.1080/09593330.2017.1337235, 2017.

WEBER, W. J., & MORRIS, J. C. Kinetics of adsorption on carbon from solution. **Journal of the Sanitary Engineering Division**, 89, 31-60, 1963.

WEI YH, WANG LF, CHANG JS, KUNG SS. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **J Biosci Bioeng** v.96p.174–8 2003.

WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. **Microbiol.**, v.153, p.3923–3938, 2007.

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnol.**, v. 26, p.321–327, 2008

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

WU, Z.; ZHONG, H.; YUAN, X.; WANG, H.; WANG, L.; CHEN, X.; ZENG, G.; WU, Y. Adsorptive removal of methylene blue by rhamnolipid-functionalized graphene oxide from wastewater **water research**. V.6 7, p. 330-344, 2014.

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

YOUSEF RI, EL-ESWED B, AL-MUHTASEB AH. Adsorption characteristics of natural zeolites as solid adsorbents for phenol removal from aqueous solutions: Kinetics, mechanis and thermodynamics studies, **Chemical Engineering Journal** v.171 p.1143-1149 2011.

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.

ZHU, K.; ROCK, C.O. RhIA converts β -Hydroxyacyl-Acyl carrier protein Intermediates in fatty Acid synthesis to the β -Hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoate Component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. of Bacteriol.**, Washington, v. 190, n. 9, p. 3147 – 3154, 2008.

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

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

ZULIANELLO, L.; CANARD, C.; KÖHLER, T.; CAILLE, D.; LACROIX, J.; MEDA, P. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary

Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and immunity**, p. 3134–3147, 2006.