

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MICROBIOLOGIA APLICADA

---

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR MUTANTES DE *Pseudomonas aeruginosa* LBI

Roberta Barros Lovaglio

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

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MICROBIOLOGIA APLICADA

---

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR MUTANTES DE *Pseudomonas  
aeruginosa* LBI

**Roberta Barros Lovaglio**

**Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero**

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

**À minha mãe, Maria Augusta B Lovaglio, exemplo de força e bondade,  
que nunca mediu esforços para me auxiliar nesta caminhada.**

**Ao meu marido, Leandro Yokota, meu porto seguro  
em todos os momentos da minha vida  
Amo muito vocês!!!!**

**Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor.  
Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e luz fornecida em cada instante de minha vida, seja na condução do trabalho seja na estruturação pessoal para enfrentar cada novidade vivenciada nesses anos!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero, cuja sabedoria e experiência de vida me proporcionaram grandes aprendizados, tanto profissionais quanto pessoais. Sua história de vida é um grande exemplo para todos nós e sua garra é contagiante.

À Fapesp pela bolsa de estudos e todo o apoio financeiro concedido.

Aos professores Dr. Rudolf Hausmann e Dr. Christoph Syldatk, às técnicas Sandra Baumann e Michaela Kügel, aos doutorandos Markus M. Müller e Barbara Hörmann e todos os funcionários do Institut für Bio- und Lebensmittel-technik Bereich II: Technische Biologie, meus sinceros agradecimentos pela recepção e apoio durante o período em que estive na Alemanha.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira, Dr. Alexandre M. do Amaral e querida amiga Paula M.M. Martins pela consultoria e auxílio na execução da parte genética deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Eberlin, Dra. Mirela Coelho e Dra. Elaine Cabral pela execução e auxílio nas análises de espectrometria de massas.

Aos professores e funcionários do departamento de Bioquímica e Microbiologia. Em especial aos técnicos de laboratório, Roberto J. Pedro, Inês Ap. B. Dalfre, Maria Luíza B. O. Rodrigues, Carmen C. de Souza e Fátima Ap. Neves, à querida secretária Angelita e Ronaldo Bella pela mão amiga nos momentos críticos. Dani e Pri pelos deliciosos cafés, imprescindíveis no período da tarde, e também pela amizade construída.

À todos os amigos, do LMI (Lú, Mari, Mary, Paulo, Fabrício, Lorenzo, Natália, Paola, Marcela, Paula e Fran), por todos os momentos compartilhados, conversas, risadas e aprendizado.

Em especial Kate, Tulio e Vinícius, meus fiéis escudeiros, muito obrigada pela ajuda na realização do trabalho, conselhos e companheirismo, enfim por tuuuudo!!!

À todos os amigos da pós-graduação por todos os momentos compartilhados, em especial ao César pela amizade, pelos momentos de descontração e pela grande ajuda nos períodos de dificuldades.

Ao meu marido, Leandro Yokota, muito obrigada por compartilhar comigo de maneira tão doce e especial todos os momentos deste trabalho, por ter compreendido e apoiado minha distância por 6 meses. Por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditei. Te amo muito!!!

À minha mãe, essa pessoa tão doce e extremamente forte. Agradeço muito pelo exemplo de pessoa que você foi e é para mim e meus irmãos. Você é minha **GUERREIRA!** Sem você nada disso seria possível. Ao meu pai, José Lovaglio, que apesar de não estar mais entre nós, sempre foi um grande estímulo para que eu chegasse até aqui.

À toda família Lovaglio, Anarelli, Belozo, Possente e Yokota pela força e apoio. Vá, sem a sua atenção e cuidados tudo seria bem mais complicado na Alemanha. Gusto, muito obrigada por cada momento compartilhado com tanto amor e pelas viagens maravilhosas que foram essenciais e inspiradoras. Lêo e tia Júlia, os bilhetinhos que vocês me escreveram antes da viagem, me deram muita força nos momentos de grande saudade.

Enfim, eu agradeço à todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os biossurfactantes são metabólitos secundários que apresentam atividade de superfície, podendo ser aplicados em diferentes processos industriais, como produção de fármacos, compostos químicos, cosméticos, biorremediação de ambientes poluídos por petróleo e derivados e recuperação terciária do petróleo. A maior vantagem destes compostos quando comparado aos surfactantes sintéticos reside na sua diversidade estrutural, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade. Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelos biotensoativos, eles não são comercialmente utilizados devido ao alto custo de produção. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de ramnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa* a partir de resíduos industriais e óleos vegetais, bem como caracterizar as propriedades de solução desses biossurfactante, além de verificar a influência da fonte de carbono na produção de homólogos de ramnolipídios por *P. aeruginosa*. Na primeira etapa as fermentações foram conduzidas em tubos de ensaio, após a seleção dos microorganismos com potencial para alta produção, os mesmos foram testados em frascos Erlenmeyer. O mutante com potencial para elevada produção foi avaliado, junto com a linhagem selvagem, em fermentadores. A linhagem selecionada e a utilização do meio de cultura livre de cálcio contendo óleo de girassol como fonte de carbono acarretou em um aumento de 70% na produção de ramnolipídios. A adição de etanol às soluções de ramnolipídios comprovou o potencial desse tensoativo para serem aplicados na indústria de cosméticos, já que as propriedades de tensão superficial, agregação e emulsificação foram mantidas nas três concentrações de álcool adicionadas. Além disso, verificou-se que a mudança da fonte de carbono acarreta alteração nos tipos ácidos graxos e proporções de homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1.

**Palavras-chaves:** biossurfactante, produção de ramnolipídios, *Pseudomonas aeruginosa*, propriedades de solução e espectrometria de massas

## ABSTRACT

The biosurfactants are secondary metabolites that exhibit surface activity and can be applied in different industrial processes such as production of pharmaceuticals, chemicals, cosmetics, bioremediation of environments polluted by oil and derivatives and tertiary recovery of oil. The greatest advantage of these compounds compared to synthetic surfactants lies in their structural diversity, low toxicity and high biodegradability. Despite the numerous advantages provided by biosurfactants, they are not commercially used due to the high cost of production.

The present study aimed to evaluate the production of rhamnolipids by mutants of *P. aeruginosa* using industrial waste and vegetable oils as carbon source, as well as to characterize the properties of these biosurfactant solutions and investigate the influence of carbon source in the production of homologous rhamnolipids by *P. aeruginosa*. In the first stage fermentations were conducted in test tubes, after selection of microorganisms with potential for high production they were tested in Erlenmeyer flasks. The mutant with the potential for increased production was assessed, along with the wild strain in bioreactors. The selected strain and the calcium free medium used with sunflower oil as carbon source resulted in an 70% increase in the production of rhamnolipids. The addition of ethanol to the rhamnolipids solutions proved the potential of this biosurfactant to be applied in the cosmetic industry, since the properties of surface tension, emulsification and aggregation were held in all three concentrations of ethanol added. Moreover, it was found that changing the carbon source caused alteration in the types of fatty acids and rhamnolipids counterparts proportions produced by *P. aeruginosa* LBI **2A1**.

**Key words:** biosurfactant, rhamnolipids production, *Pseudomonas aeruginosa*, solution properties and mass spectrometry

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AHA - ácido hidroxialcanóico
- AMM - água de maceração de milho
- BOA - borra de óleo de algodão
- BOM - borra de óleo de milho
- BOS - borra de óleo de soja
- C<sub>12</sub>HSL - dodecanoil homoserina lactona
- C<sub>4</sub>HSL - butanoil homoserina lactona
- CG - cromatografia gasosa
- CMC - concentração micelar crítica
- CN - caldo nutriente
- EtOH – etanol
- HPLC - High Performance Liquid Chromatography
- KAN - canamicina
- LB - Luria Bertani
- m/z - massa/carga
- MLC - meio mineral livre de cálcio
- MLCTF - meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato
- MS - mass spectrometry
- OM - óleo de mamona
- PQS - *Pseudomonas* Quinolona Sinal
- QS - Quorum sensing
- Q-TOF - quadrupole -time of flight
- RL – ramnolipídio
- SR - sais de Robert
- Y<sub>P/S</sub> . fator de conversão produto/ substrato
- Y<sub>P/X</sub> . fator de conversão produto/ biomassa

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Estrutura dos quatro principais homólogos dos ramnolipídios. R1 e R2 – 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à duas moléculas de ácido graxo; R3 e R4 - 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à uma molécula de ácido graxo..... 20
- Figura 2** – Esquema da formação de íon no sistema de ionização por Eletrospray (Fonte: Universidade de Bristol)..... 21
- Figura 3** - Rota biossintética para produção de ácidos graxos e desvio de ácidos 3-hidróxi-alcanóicos (AHA) para a síntese de ramnolipídios (modificado de ABDEL-MAWGOUD et al., 2011)..... 24
- Figura 4** - Modelo para regulação da síntese de ramnolipídio (OCHSNER e REISER, (1995)..... 25
- Figura 5** - Cascata Regulatória envolvendo LasR e RhIR e seus autoindutores (LATIFI *et al.*, 1996- modificado)..... 27
- Figura 6** - Circuito regulatório dos sistemas de quorum sensing em *Pseudomonas aeruginosa* (ativação —|, inibição ↘). odDHL- dodecanoil homoserina lactona; BHL- butanoil homoserina lactona e PQS – *Pseudomonas* quinolona sinal. (JUHAS *et al.*, 2005)..... 28

### CAPÍTULO I

- Figura 3.1** - Teste de resistência a canamicina por *P. aeruginosa* LBI. Esta figura mostra os resultados obtidos com as concentrações do antibiótico variando de 200 a 900 µg/ml. Na placa controle não foi adicionado antibiótico. Marcações em vermelho indicam a presença de colônias..... 41
- Figura 3.2** - Colônias obtidas após o processo de eletroporação. Placas com 600 e 700 µg/ml de canamicina; controle – 100 µg/ml..... 43
- Figura 3.3** - Halo formado pela produção de ramnolipídio pelo mutante 2G2..... 44
- Figura 3.4** - Produção de ramnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa* LBI, utilizando borra de óleo de algodão como fonte de carbono..... 45

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3.5</b> - Produção de ramnolipídios por mutantes de <i>P. aeruginosa</i> LBI, utilizando borra de óleo de soja como fonte de carbono.....  | 45 |
| <b>Figura 3.6</b> - Produção de ramnolipídios por mutantes de <i>P. aeruginosa</i> LBI, utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono..... | 46 |
| <b>Figura 3.7</b> - Produção de ramnolipídios por mutantes de <i>P. aeruginosa</i> LBI, utilizando óleo de mamona como fonte de carbono.....         | 47 |

## CAPÍTULO II

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4.1</b> - (a) Crescimento celular (g/L) e (b) produção de ramnose (mg/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI 1B10, 1C10, 1E3 e 1F8), utilizando borra de óleo de algodão como fonte de carbono e NaNO <sub>3</sub> como fonte de nitrogênio.....   | 57 |
| <b>Figura 4.2</b> - (a, b) Crescimento celular (g/L) e (c, d) produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1B10, 1C10, 1E3 e 1F8</b> ), utilizando borra de óleo de algodão como fonte de carbono e 50% NaNO <sub>3</sub> + 50% AMM (a, c) e 100% AMM (b, d) como fonte de nitrogênio..... | 58 |
| <b>Figura 4.3</b> - (a) Crescimento celular (g/L) e (b) produção de ramnose (mg/L) da linhagem selvagem quatro mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI 2G2, 3C10, 4B7 e 4E11), utilizando borra de óleo de soja como fonte de carbono e NaNO <sub>3</sub> como fonte de nitrogênio.....  | 61 |
| <b>Figura 4.4</b> - (a, b) Crescimento celular (g/L) e (c, d) produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2G2, 3C10, 4B7 e 4E11</b> ), utilizando borra de óleo de soja como fonte de carbono e 50% NaNO <sub>3</sub> + 50% AMM (a, c) e 100% AMM (b, d) como fonte de nitrogênio.....    | 63 |
| <b>Figura 4.5</b> - (a) Crescimento celular (g/L) e (b) produção de ramnose (mg/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI 1B10, 2B4, 2H5 e 4E11), utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono e NaNO <sub>3</sub> como fonte de nitrogênio.....   | 67 |
| <b>Figura 4.6</b> - (a, b) Crescimento celular (g/L) e (c, d) produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1B10, 2B4, 2H5 e 4E11</b> ), utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono e 50% NaNO <sub>3</sub> + 50% AMM (a, c) e 100% AMM (b, d) como fonte de nitrogênio.....   | 68 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 4.7</b> - Crescimento celular (g/L) e produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI 1B10, 2A1, 2B10 e 4E3), utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono e NaNO <sub>3</sub> (a, c) e AMM (b,d) como fonte de nitrogênio.....  | 72 |
| <b>Figura 4.8</b> - Crescimento celular (g/L) e produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> LBI e 5 mutantes ( <i>P. aeruginosa</i> LBI 1B10, 1C10, 2A1, 2B10 e 4E3), utilizando óleo de mamona como fonte de carbono e NaNO <sub>3</sub> (a, c) e AMM (b,d) como fonte de nitrogênio – Note que há diferença de escala no eixo y entre os gráficos c e d.....                                    | 75 |
| <b>Figura 4.9</b> - (a) Crescimento celular (g/L) e (b) produção de ramnolipídios (g/L) do mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando borra de óleo de milho e óleo de mamona como fontes de carbono e NaNO <sub>3</sub> e AMM como fontes de nitrogênio.....   | 78 |
| <br><b>CAPÍTULO III</b>   |    |
| <b>Figura 5.1</b> - Quebrador mecânico de espuma acoplado ao fermentador Biostat Cplus – 42L.....   | 84 |
| <b>Figura 5.2</b> - Crescimento celular (g/L) da linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> LBI e do mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, em fermentações utilizando meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF).....  | 88 |
| <b>Figura 5.3</b> - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de ramnolipídios (a) pela linhagem selvagem e mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, em meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF) e óleo de girassol como fonte de carbono (b) mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando o meio salino descrito por Robert et al., (1989) e borra de óleo de milho (BOM) como fonte de carbono..... | 89 |
| <b>Figura 5.4</b> - Crescimento celular (g/L), produção de ramnolipídios (g/L), consumo de óleo e nitrogênio da linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> LBI (a) e do mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 (b) utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.....   | 91 |
| <b>Figura 5.5</b> - Velocidade Específica de Crescimento (g/L.h) e produtividade de ramnolipídios (g rhl/ g cél. h) da linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> LBI (a) e do mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 (b).....  | 93 |
| <b>Figura 5.6</b> - Crescimento celular (g/L), produção de ramnolipídios (g/L), consumo de óleo do mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 (a) utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.....  | 95 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 5.7</b> - Velocidade Específica de Crescimento (g/L.h) e produtividade de ramnolipídios (g rhl/ g cél. h) do mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1.....  | <b>96</b>  |
| <b>Figura 5.8</b> – PCR de colônia para verificar a presença do transposon tn5 no cromossomo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1.....  | <b>98</b>  |
| <b>Figura 5.9</b> - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de ramnolipídios (a) experimentos do grupo 1 - G1 (b) experimentos do grupo 2 –G2. Os mutantes analisados em cada etapa são descritos nas CCD. As setas indicam os mutantes selecionados para a próxima etapa..... | <b>103</b> |
| <b>Figura 5.10</b> – Produção de ramnolipídios (g/L) pelos mutantes phzC2, mexX, ptxR, rpoS e <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, após 72 horas de cultivo em frascos de Erlenmeyer à 30°C e 200 rpm, utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.....                                      | <b>104</b> |
| <b>Figura 5.11</b> - Crescimento celular (g/L), produção de ramnolipídios (g/L) e consumo de óleo do mutante rpoS. A curva em cinza refere-se à produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1. Experimentos realizados em bioreator Infors – 13L.....                          | <b>105</b> |

#### CAPÍTULO IV

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 6.1</b> – Tensão Superficial (mN/m) de soluções com diferentes concentrações de ramnolipídios (1 – 1000 mg/L).....                         | <b>112</b> |
| <b>Figura 6.2</b> – Medidas de turbidez ( $A_{600nm}$ ) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.....                         | <b>113</b> |
| <b>Figura 6.3</b> - Medidas de turbidez e tensão superficial da solução de ramnolipídios 1,0 g/L com variação de pH de 4,0 à 9,0.....                | <b>114</b> |
| <b>Figura 6.4</b> – Efeito da adição de NaCl na tensão superficial (mN/m) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.....       | <b>115</b> |
| <b>Figura 6.5</b> – Efeito da adição de NaCl na turbidez ( $A_{600nm}$ ) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.....        | <b>116</b> |
| <b>Figura 6.6</b> – Efeito da variação do pH na turbidez das soluções de ramnolipídios (1g/L) contendo NaCl (0,1; 0,4 e 0,8M) como aditivo.....      | <b>117</b> |
| <b>Figura 6.7</b> – Efeito da adição de $C_2H_5OH$ na tensão superficial (mN/m) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L..... | <b>118</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 6.8</b> – Efeito da adição de C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH na turbidez (A <sub>600nm</sub> ) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.....   | 119 |
| <b>Figura 6.9</b> – Efeito da variação do pH na turbidez (a) e na atividade de emulsificação (b) das soluções de ramnolipídios (1g/L) contendo etanol (0,3; 0,3 e 0,3M) como aditivo.....                                   | 121 |
| <b>Figura 6.10</b> – ESI (-) – MS de amostras de ramnolipídios produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 a partir de diferentes fontes de carbono (a) óleo de girassol (b) borra de óleo de milho (c) óleo de mamona..... | 123 |
| <b>Figura 6.11</b> - ESI (-) – MS/MS Do íon m/z 257 (a) e m/z 437 (b) proveniente da amostra de ramnolipídios produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 a partir de óleo de mamona.....                                   | 125 |
| <b>Figura 6.12</b> - ESI (-) – MS/MS do íon m/z 453 (a) e m/z 481 (b) proveniente da amostra de ramnolipídios produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 a partir de óleo de mamona.....                                   | 126 |
| <b>Figura 6.13</b> - ESI (-) – MS/MS do íon m/z 503 (a) e m/z 649 (b).....  | 129 |
| <b>Figura 6.14</b> - ESI (-) – MS/MS dos íons m/z 475 (a), m/z 531(b), m/z 621(c), m/z 675 (d) e m/z 677(e).....  | 130 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 4.1</b> - Lista de mutantes e fontes de carbono avaliados.....  | <b>50</b> |
| <b>Tabela 4.2</b> – Proporção de NaNO <sub>3</sub> e água de maceração de milho no meio de cultivo para produção de ramnolipídios por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI e seus mutantes.....  | <b>51</b> |
| <b>Tabela 4.3</b> - Fatores de conversão biomassa/ produto (Y <sub>p/x</sub> ), da produção de ramnolipídios por mutantes e linhagem selvagem cultivados em diferentes fontes de nitrogênio e borra de óleo de algodão como fonte de carbono.....   | <b>59</b> |
| <b>Tabela 4.4</b> - Fatores de conversão biomassa/ produto (Y <sub>p/x</sub> ), da produção de ramnolipídios por mutantes e linhagem selvagem cultivados em diferentes fontes de nitrogênio e borra de óleo de soja como fonte de carbono.....  | <b>65</b> |
| <b>Tabela 4.5</b> - Fatores de conversão biomassa/ produto (Y <sub>p/x</sub> ), da produção de ramnolipídios por mutantes e linhagem selvagem cultivados em diferentes fontes de nitrogênio e borra de óleo de milho como fonte de carbono.....   | <b>70</b> |
| <b>Tabela 4.6</b> - Fatores de conversão produto / substrato (Y <sub>p/s</sub> ) e produto / biomassa (Y <sub>p/x</sub> ) da linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> LBI e dos mutantes <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1B10</b> , <b>2A1</b> , <b>2B10</b> e <b>4E3</b> em fermentações com borra de óleo de milho como fonte de carbono..... | <b>73</b> |
| <b>Tabela 4.7</b> - Fatores de conversão produto / substrato (Y <sub>p/s</sub> ) e produto / biomassa (Y <sub>p/x</sub> ) da linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> LBI e dos mutantes <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1B10</b> , <b>2A1</b> , <b>2B10</b> e <b>4E3</b> em fermentações com óleo de mamona como fonte de carbono.....         | <b>76</b> |

### CAPÍTULO III

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 5.1</b> – Mutantes randômicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 e as respectivas alterações genéticas.....   | <b>81</b> |
| <b>Tabela 5.2</b> – Variação da proporção di- / mono-ramnolipídios produzida pela linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> LBI e o mutante <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2A1</b> durante a fermentação em biorreator (22 à 160 horas)..... | <b>92</b> |

## CAPÍTULO IV

**Tabela 6.1** – Composição química e abundância relativa de ácidos graxos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (O.G – óleo de girassol; B.O.M – borra de óleo de milho, O.M – óleo de mamona)..... **124**

**Tabela 6.2** – Composição química e abundância relativa dos homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 (O.G – óleo de girassol; B.O.M – borra de óleo de milho, O.M – óleo de mamona)..... **128**

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>20</b> |
| 1.1 Biossurfactantes.....  | 20        |
| 1.1.1 Classes dos biossurfactantes .....   | 20        |
| 1.1.2 Espectrometria de massas e determinação de homólogos de ramnolipídios .....          | 21        |
| 1.1.2 Biossíntese de Ramnolipídios .....   | 23        |
| 1.1.3 Regulação genética da produção de ramnolipídios .....                                | 27        |
| 1.2 Produção de Biossurfactantes.....  | 29        |
| 1.2.1 Substratos alternativos/ Resíduos.....   | 30        |
| 1.2.2 Fatores que influenciam a produção .....   | 30        |
| 1.2.3 Produção de biossurfactante por micro-organismos mutantes .....                      | 32        |
| 1.3 Aplicações .....   | 32        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>3. CAPÍTULO I.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>MUTAÇÃO RANDÔMICA E SELEÇÃO INICIAL DE CLONES PRODUTORES DE RAMNOLIPÍDIOS.....</b>      | <b>36</b> |
| <b>3.1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>38</b> |
| 3.2.1 Micro-organismos.....  | 38        |
| 3.2.1.1 Teste de Resistência à Antibióticos.....   | 38        |
| 3.2.1.2 Obtenção de mutantes randômicos para estirpe de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 38 |           |
| 3.2.2 Seleção dos Mutantes de Interesse .....  | 39        |
| 3.2.3 Meios de cultura e condições de cultivo .....  | 40        |
| 3.2.4 Métodos Analíticos.....  | 41        |
| 3.2.4.1 Determinação da concentração de ramnose.....                                       | 41        |
| <b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>42</b> |
| 3.3.1 Teste de resistência a antibióticos .....  | 42        |
| 3.3.2 Mutação Randômica .....  | 43        |
| 3.3.3 Mutantes com potencial para produção de ramnolipídios .....                          | 44        |
| 3.3.4 Experimentos em tubos de ensaio – Screening .....                                    | 45        |
| 3.3.4.1 Borra de Óleo de Algodão .....   | 45        |
| 3.3.4.2 Borra de Óleo de Soja.....   | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.4.3 Borra de Óleo de Milho .....   | 47        |
| 3.3.4.4 Óleo de Mamona .....   | 47        |
| <b>4. CAPÍTULO II .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>FERMENTAÇÃO EM FRASCO – SELEÇÃO DE MUTANTES COM ALTA<br/>PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS.....</b> | <b>49</b> |
| <b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>51</b> |
| 4.2.1 Micro-organismos.....  | 51        |
| 4.2.2 Meios de cultura .....   | 52        |
| 4.3.3 Condições de cultivo.....  | 52        |
| 4.3.4 Métodos Analíticos .....   | 54        |
| 4.3.4.1 Processamento das amostras.....  | 54        |
| 4.3.4.2 Avaliação da produção de Ramnolipídios .....   | 54        |
| 4.3.4.3 Determinação da biomassa microbiana .....  | 56        |
| 4.3.4.4 Determinação do óleo residual.....   | 56        |
| <b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>57</b> |
| 4.3.1 Experimentos em Erlenmeyer - Etapa A.....  | 57        |
| 4.3.1.1 Borra de Óleo de Algodão .....   | 57        |
| 4.3.1.2 Borra de Óleo de Soja.....   | 61        |
| 4.3.1.3 Borra de Óleo de Milho .....   | 67        |
| 4.3.2 Experimentos em Erlenmeyer - Etapa B.....  | 71        |
| 4.3.2.1 Borra de Óleo de Milho .....   | 72        |
| 4.3.2.2 Óleo de Mamona .....   | 75        |
| 4.3.2.3 Aumento da concentração das fontes de carbono .....                                    | 78        |
| <b>5. CAPÍTULO III.....</b>  | <b>80</b> |
| <b>PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS EM BIORREATOR .....</b>   | <b>80</b> |
| <b>5.1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>81</b> |
| <b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>82</b> |
| 5.2.1 Micro-organismos.....  | 82        |
| 5.2.2 Meios de cultura .....   | 83        |
| 5.2.3 Condições de cultivo.....  | 83        |
| 5.2.3.2 Experimento em Frasco – MLCTP .....  | 84        |
| 5.2.3.3 Experimentos Biorreator.....   | 84        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.2.4 Métodos Analíticos .....   | 86         |
| 5.2.4.5 Determinação do consumo de nitrogênio .....  | 87         |
| 5.2.4.6 Confirmação da Inserção do Transposon .....  | 87         |
| <b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>88</b>  |
| 5.3.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF) / Óleo de Girassol ..                      | 88         |
| 5.3.2 Experimentos em Biorreator .....   | 91         |
| 5.3.2 Verificação da Inserção do Transposon .....  | 99         |
| 5.3.3 Micro-organismos da biblioteca de mutantes da Universidade de Washington ...                       | 103        |
| <b>6. CAPÍTULO IV .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>PROPRIEDADES DE SOLUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE HOMÓLOGOS .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>6.1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>110</b> |
| 6.2.1 Propriedades da Solução de Ramnolipídios .....   | 110        |
| 6.2.1.1 Preparo da Solução de Ramnolipídios .....  | 110        |
| 6.2.1.3 Métodos Analíticos .....   | 111        |
| 6.2.1.2.1 Tensão Superficial .....   | 111        |
| 6.2.1.2.2 Turbidez .....   | 111        |
| 6.2.2 Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios por Espectrometria de Massas .....                   | 111        |
| 6.2.2.1 Produção de Ramnolipídios .....  | 111        |
| 6.2.2.2 Extração de Ramnolipídios .....  | 112        |
| 6.2.2.3 Preparo das amostras .....   | 112        |
| 6.2.2.4 Espectrometria de Massas – ESI-MS e ESI-MS/MS .....  | 112        |
| <b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>113</b> |
| 6.3.1 Propriedades da Solução de Ramnolipídios – Efeito de aditivos .....                                | 113        |
| 6.3.1.1 Solução sem aditivos - controle .....  | 113        |
| 6.3.1.2 Efeito da adição de NaCl às soluções de Ramnolipídios .....                                      | 116        |
| 6.3.1.3 Efeito da adição de Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) às soluções de Ramnolipídios ..... | 119        |
| 6.3.2 Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 .....    | 122        |
| <b>7.0 CONCLUSÕES .....</b>  | <b>132</b> |
| <b>8.0 PESQUISAS FUTURAS .....</b>   | <b>133</b> |
| <b>9.0 REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>134</b> |

## 1.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são metabólitos que apresentam atividade superficial. São sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos cultivados em diferentes fontes de carbono. 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 e MAKKAR, 1998).

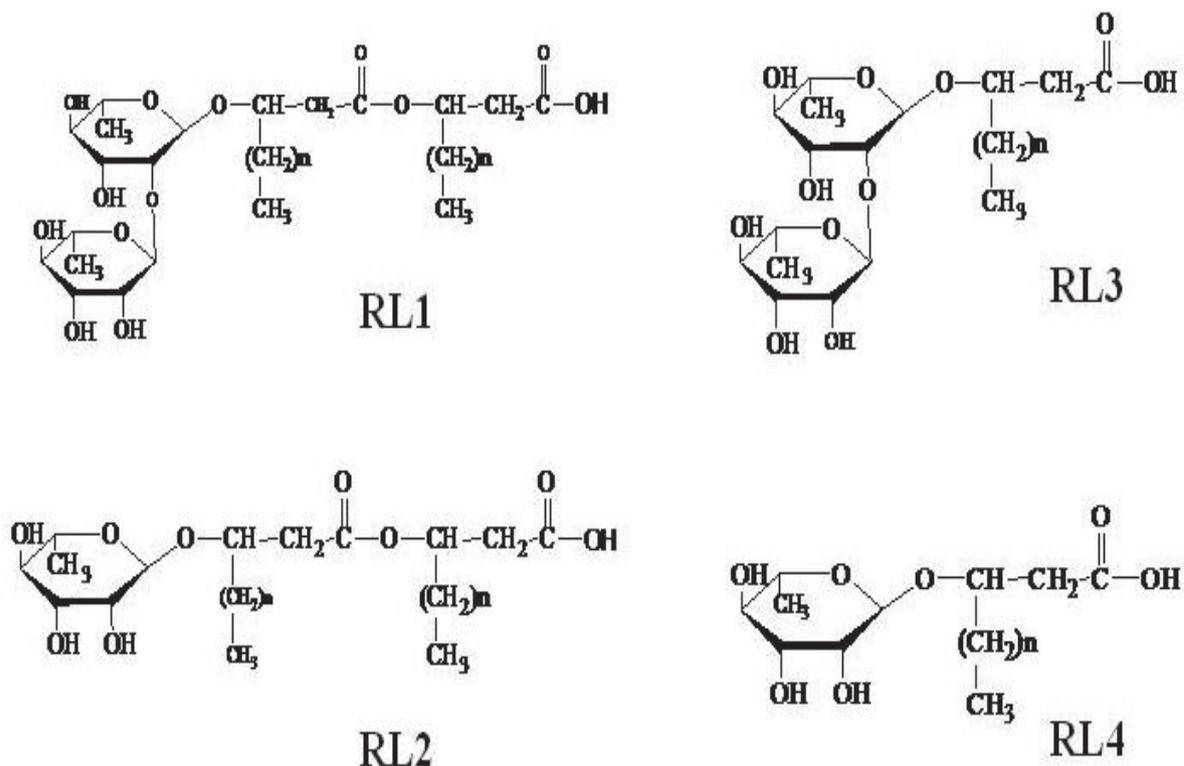
As porções hidrofílicas e hidrofóbicas presentes na molécula de surfactante tendem a se distribuírem na interface de fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Esta distribuição das moléculas é responsável pela principal propriedade desses compostos, que é a capacidade de redução das tensões superficial e interfacial. Estas propriedades os tornam adequados para serem utilizados em diferentes aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT *et al.*, 2000).

#### 1.1.1 Classes dos biossurfactantes

Os surfactantes sintéticos são usualmente classificados de acordo com o grupo polar, entretanto os biossurfactantes são diferenciados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes de biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteína, ácidos graxos e fosfolipídios e biossurfactantes poliméricos (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

*Pseudomonas aeruginosa* sintetizam glicolipídios denominados ramnolipídios, a porção hidrofílica desse tensoativo é composta por moléculas de ramnose, enquanto ácidos 3-hidroxiálcanóicos constituem a parte hidrofóbica (JARVIS *et al.*, 1949). A mistura de homólogos de ramnolipídios 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 produzidos por *P. aeruginosa* têm sido bem estudados e são reportados como uma mistura de espécies homólogas de RL1 (Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), RL2 (RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), RL3 (Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>) e RL4 (RhaC<sub>10</sub>) (Fig. 1) (LANG e WAGNER, 1987).



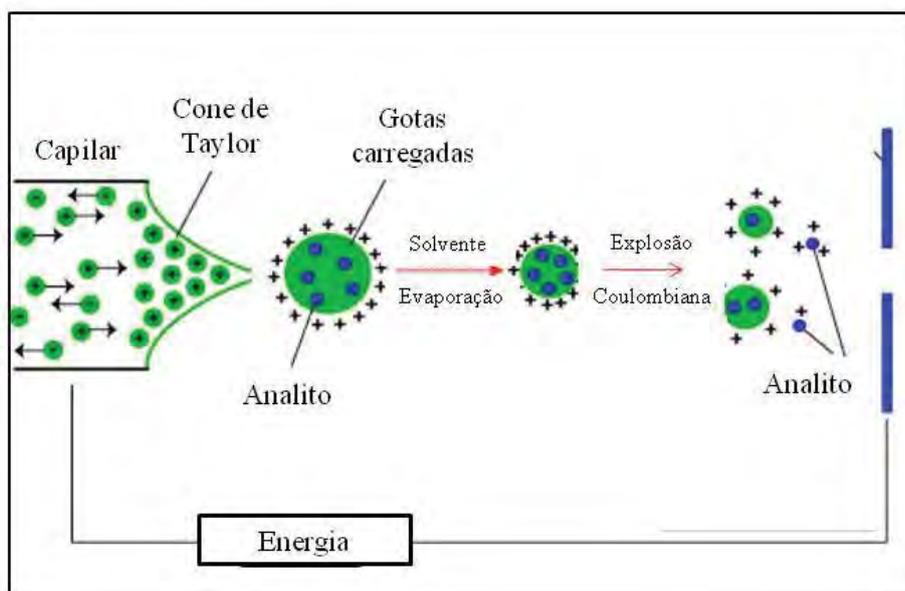
**Figura 1** - Estrutura dos quatro principais homólogos dos ramnolipídios. R1 e R2 – 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à duas moléculas de ácido graxo); R3 e R4 - 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à uma molécula de ácido graxo.

### 1.1.2 Espectrometria de massas e determinação de homólogos de ramnolipídios

A análise por espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*) consiste na ionização das moléculas de interesse e separação dos íons com base em suas diferentes razões massa/carga ( $m/z$ ). Em geral a análise de um composto compreende 5 etapas: (1) introdução da amostra, que pode ser feita via HPLC, CG ou bomba com seringa (2) ionização das moléculas (3) passagem pelo analisador de massas que separa os íons de acordo com a razão  $m/z$  (4) Detector – conversão da quantidade de íons em sinal de corrente elétrica e (5) processador – transforma o sinal elétrico em função da razão  $m/z$  gerando o espectro de massas correspondente (Silverstain et al., 2005 citado por ROMÃO 2010, p. 113).

Os íons podem ser gerados por diferentes técnicas, dentre elas a ionização por eletrospray (ESI- *Electrospray Ionization*), método utilizado para a análise de ramnolipídios no presente estudo, que consiste em uma técnica menos agressiva, onde os íons são gerados em condições mais suaves de temperatura e pressão. Os íons são formados a pressão ambiente pressão, via protonação, desprotonação, cationização ou

anionização das moléculas presentes através da adição de ácido ou base às soluções (ALBERICI et al., 2010). Os íons são conduzidos por um capilar metálico submetido a um alto potencial elétrico, resultando na formação de gotas carregadas. A evaporação do solvente, devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas em suas superfícies, o que leva a formação de um “spray” de íons,  $[M+H]^+$  ou  $[M+H]^-$ , que serão conduzidos para um ambiente de alto vácuo no espectrômetro de massas, onde ocorrerá a detecção e caracterização dos mesmos (Fig. 2) (CROTTI et al., 2006).



**Figura 2** – Esquema da formação de íon no sistema de ionização por Eletrospray (Fonte: Universidade de Bristol).

Da mesma maneira que ocorre com as técnicas de ionização, existem diferentes analisadores de massa, entretanto serão descritos brevemente apenas o quadrupolar e o tempo de voo. O analisador quadrupolar (Q) corresponde à separação dos íons por sua estabilidade de trajetória em um campo criado por oscilações elétricas aplicadas nos cilindros metálicos, já o analisador por tempo de voo (TOF - *Time of Flight*), consiste na aplicação de um pulso de energia igual a todos os íons, que são acelerados de maneira diferente devido à sua razão  $m/z$  e, portanto chegam ao detector em tempos diferentes, permitindo a determinação da razão  $m/z$  de acordo com o tempo de voo de cada íon, permitindo a análise de compostos de baixa massa molar até macromoléculas (ROMÃO 2010).

O desenvolvimento de métodos analíticos modernos e sensíveis como a espectrometria de massas, tem permitido a descoberta de uma ampla diversidade de

estruturas de homólogos dos ramnolipídios, aproximadamente 60 congêneres foram descritos (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). A composição e distribuição de homólogos em uma mistura de ramnolipídios são determinadas pela linhagem bacteriana utilizada, condições de cultivo e composição do meio. Já as propriedades do biossurfactante produzido dependem da quantidade e tipo de homólogos presentes (GUERRA-SANTOS, et al., 1984).

Alguns autores reportam os monoramnolipídeos como componente predominante na mistura de ramnolipídios (ARINO et al., 1996; SIM et al., 1997) enquanto outros descrevem que os diramnolipídios são os componentes em maioria (DEZIEL et al., 2000, MATA-SANDOVAL et al., 2001; BENINCASA et al., 2004).

A linhagem de *P. aeruginosa* NY3, foi capaz de sintetizar 25 diferentes homólogos de ramnolipídios quando crescida em glicerol como fonte de carbono. A estrutura de dez homólogos produzidos por esta linhagem nunca foram descritas, dentre os novos ramnolipídios encontram-se 5 mono-ramnolipídios (Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8:1</sub>; Rha-C<sub>16</sub>; Rha-C<sub>16:1</sub>; Rha-C<sub>17:1</sub>; e Rha-C<sub>24:1</sub>) e 5 di-ramnolipídios (Rha-Rha-C<sub>6</sub>-C<sub>6:1</sub>; Rha-Rha-C<sub>9:1</sub>; Rha-Rha-C<sub>10:1</sub>-C<sub>10:1</sub>; Rha-Rha-C<sub>24</sub>; e Rha-Rha-C<sub>24:1</sub>) (NIE et al., 2010).

### 1.1.2 Biossíntese de Ramnolipídios

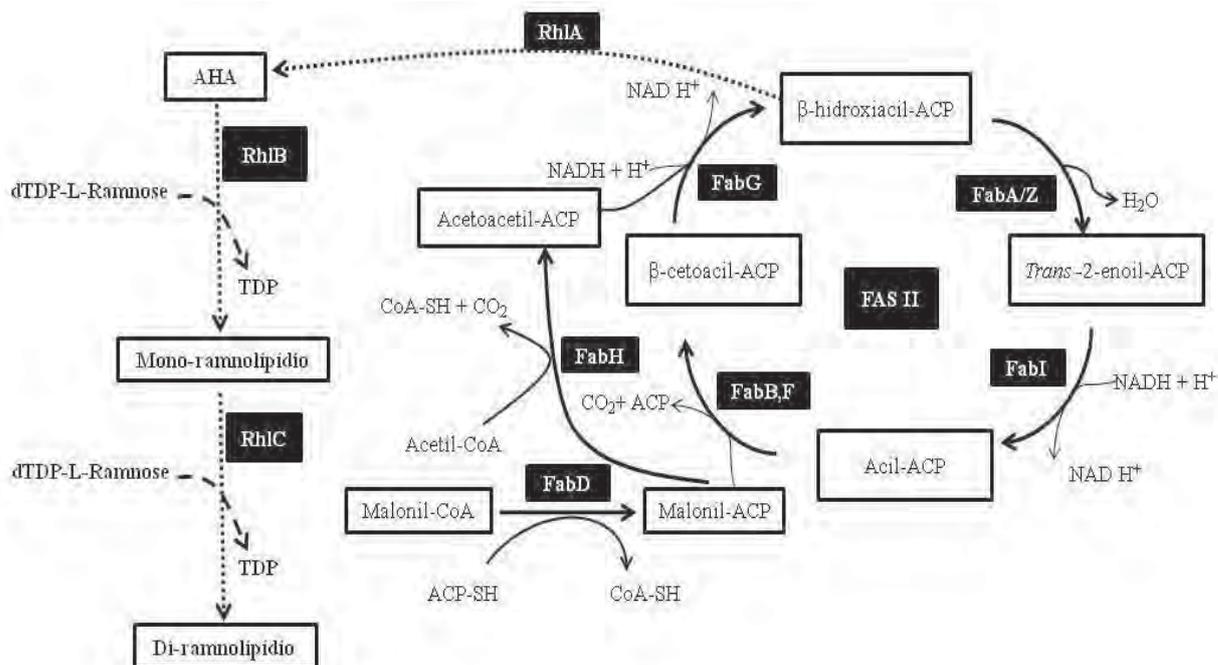
A estrutura anfipática dos biossurfactantes compreende uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, em muitos casos a síntese das porções hidrofílicas e hidrofóbicas deriva diretamente do metabolismo primário. As rotas para a síntese desses precursores são diversas e utilizam grupos específicos de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

Segundo Syldatk 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.

Há ainda a possibilidade da síntese das porções hidrofílica e hidrofóbica ocorrerem via síntese *de novo*, o que é comum ocorrer durante a produção dos ramnolipídios. De acordo com Zhu and Rock (2008) a estereoquímica dos  $\beta$ -hidroxiácidos dos ramnolipídios correspondem a intermediários da biossíntese dos ácidos graxos e não à intermediários da  $\beta$ -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). De acordo com Hoang e Schweizer (1999) a maquinaria enzimática de *P. aeruginosa* para o ciclo FASII é a mesma descrita para *E. coli*.

A biossíntese de ácidos graxos é dividida em duas etapas: **1.** Iniciação e **2.** alongamento. A iniciação requer malonil-CoA e malonil-ACP, o primeiro é sintetizado pela acetil-CoA carboxilase e o segundo é derivado do malonil-CoA e ACP pela ação da enzima malonil-CoA-ACP transacilase (FabD). Cada ciclo de alongamento compreende quatro reações químicas, primeiramente, ocorre a condensação de malonil-ACP com acetil-CoA pela enzima FabH, os ciclos subsequentes são iniciados pela condensação de malonil-ACP com Acil-ACP, pela ação da enzima FabB (ácidos graxos saturados) ou FabF (ácidos graxos insaturados). No segundo passo o  $\beta$ -cetoacil formado anteriormente é reduzido à  $\beta$ -hidroxiacil-ACP, reação catalisada pela FabG. A enzima responsável pela reação da terceira etapa é FabA ou FabZ e envolve a desidratação do  $\beta$ -hidroxiacil-ACP formando *trans*-2-enoil-ACP, que na última etapa é reduzido à acil-ACP na presença de NADH e FabI (HOANG E SCHWEIZER 1997). A porção lipídica dos ramnolipídios corresponde aos hidroxiácidos formados na segunda etapa da elongação (Fig. 3).



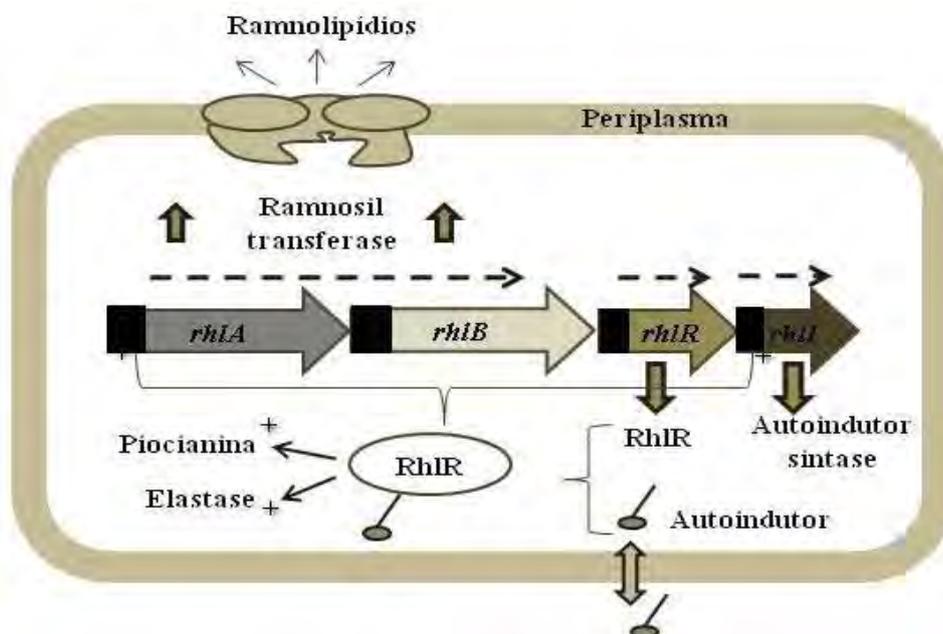
**Figura 3** - Rota biossintética para produção de ácidos graxos e desvio de ácidos 3-hidróxi-alcanóicos (AHA) para a síntese de ramnolipídios (modificado de ABDEL-MAWGOUD et al., 2011).

A conversão biossintética de glicose em ramnose ocorre através da ação da fosfoglicomutase AlgC, já que mutantes *algC* não produziram ramnolipídios (OLVERA et al., 1999). 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). Essa rota explica somente como a ramnose é produzida a partir da glicose, entretanto outros substratos são utilizados para a produção de ramnolipídios, como os óleos vegetais e o glicerol (NITSCHKE et al., 2005; CHEN et al., 2007a), neste caso, as rotas biossintéticas deverão ainda ser elucidadas.

As condições de cultivo e a utilização de diferentes fontes de carbono influenciam a produtividade e a composição do produto final (SYLDATK *et al.*, 1985), porém o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos utilizados como substratos, não exercem influência no comprimento da cadeia dos ácidos graxos dos glicolipídios (SYLDATK *et al.*, 1985).

Ochsner and Reiser (1995) propuseram um modelo para a síntese de ramnolipídios, onde consideraram que o grupo gênico *rhlABR* codifica uma proteína regulatória (RhlR) e uma ramnosiltransferase de membrana (RhlB) que promove a ligação da molécula de dTDP-L-ramnose à cadeia acil da molécula de ramnolipídio. Outro gene, *rhlII*, foi identificado após o grupo *rhlABR* e é responsável pela síntese do autoindutor, N-butanol-

L-homoserina lactona. A proteína regulatória RhIR é ativada pela ligação do autoindutor e a ligação desta ao promotor do operon *rhlAB* intensifica a transcrição das ramnosiltransferases, que são enzimas chave para a biossíntese dos ramnolipídios (Fig. 4).



**Figura 4** - Modelo para regulação da síntese de ramnolipídio (OCHSNER e REISER, (1995).

Rahim *et al.*, (2001) realizaram a caracterização molecular do gene *rhlC*, que codifica uma proteína com região hidrofóbica transmembrana, responsável pela codificação da ramnosiltransferase 2 envolvida na produção de di-ramnolipídio em *P. aeruginosa*. Os autores concluíram que esta era a função desta enzima, porque linhagens nocauteadas no gene *rhlC*, produziam apenas compostos com uma molécula de ramnose (RL2 – Fig. 1).

Déziel *et al.*, (2003) apresentaram evidências de que o gene *rhlA* está envolvido na síntese dos ácidos 3-hidroxicanoicos (AHA), que são os precursores lipídicos dos ramnolipídios e substrato da ramnosiltransferase 1 (RhIB). Eles observaram que em mutantes com deleção nos genes *rhlA* e *rhlB* não havia produção de AHA e ramnolipídios, respectivamente. A homologia de RhIA com transacilases, como a PhaG envolvida na síntese de poli-hidroxicanoatos (PHA), levou a proposição de que RhIA é uma transacilase que catalisa a transferência do  $\beta$ -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 AHA na presença de RhIA. Esses autores encontraram que o substrato preferencial dessa enzima é  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP, pois ao

utilizar  $\beta$ -hidroxidecanoil-CoA não houve síntese de ácido 3-hidroxialcanóico, mesmo em uma concentração de RhlA dez vezes mais alta. Dessa maneira propuseram um modelo simplificado para a síntese do tensoativo, onde RhlA desvia  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP da bioassíntese de ácido graxo (ciclo FASII) para a produção de AHA. Este estudo refutou 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.

De acordo com esta proposta o primeiro passo da rota envolve a síntese dos precursores do ramnolipídio, dTDP-L-ramnose e  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato. Na próxima etapa eles são unidos pela ramnosiltransferase 1, codificada pelo operon rhlB, formando o mono-ramnolipídio (RL2), parte destas moléculas são excretadas e uma outra porção recebe mais uma molécula de ramnose, através da ação da ramnosiltransferase codificada pelo gene rhlC (Fig. 3).

### 1.1.3 Regulação genética da produção de ramnolipídios

Muitas bactérias exploram a comunicação célula-célula como estratégia para regular diversos processos fisiológicos incluindo bioluminescência, desenvolvimento de competência, biossíntese de antibióticos, transferência conjugativa de plasmídios, além da produção de fatores relacionados à sua virulência. (SALMOND *et al.*, 1995)

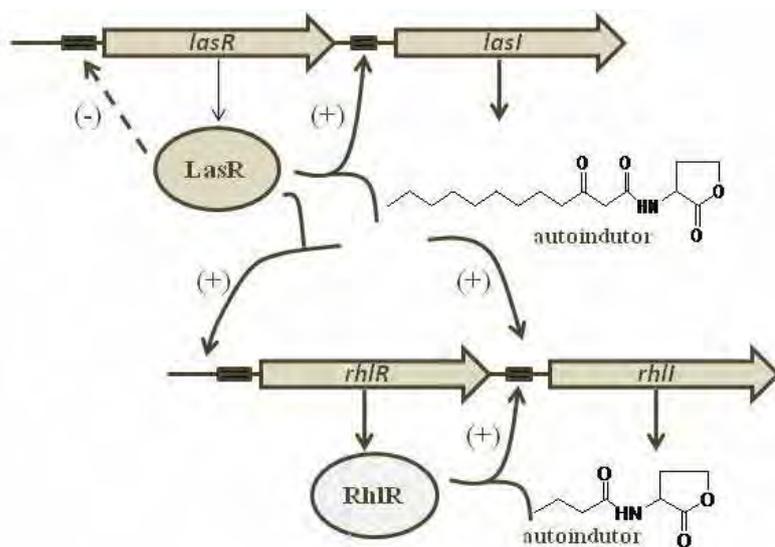
Em *P. aeruginosa*, a produção de muitos fatores de virulência e metabólitos secundários é regulada em conjunto com a densidade celular através de um sistema denominado quorum sensing (LATIFI *et al.*, 1996). O quorum sensing é caracterizado pela produção de compostos difusíveis denominados autoindutores,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

As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam dois sistemas de quorum sensing (QS), o las e o rhl. O primeiro tem como regulador transcricional o LasR, que é ativado pelo autoindutor *N*-(3-oxodecanoil)-L-homoserina lactona ( $C_{12}$ HSL) cuja síntese é direcionada por lasI (GAMBELLO *et al.*, 1993; PEARSON *et al.*, 1994). No sistema rhl a síntese do autoindutor *N*-butanol-L-homoserina lactona ( $C_4$ HSL) ocorre através da sintase

RhII que se complexa à RhIR, que é o ativador transcricional deste sistema (PEARSON *et al.*, 1995; WINSON *et al.*, 1995). Os autoindutores de diferentes espécies de bactérias diferem primariamente na (I) presença ou ausência de uma cadeia acil substituinte no C3 (oxo- ou hidroxil-) e (II) comprimento da cadeia acil lateral (WINSON *et al.*, 1995)

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

A presença de dois circuitos regulatórios, mediados por autoindutores distintos levantou a hipótese da existência de uma hierarquia complexa envolvida na regulação dos genes controlados por QS. Latifi *et al.*, (1996) propôs uma cascata regulatória que interliga LasR/OdDHL e RhIR/ BHL., onde LasR seria considerado o regulador mestre (Fig. 5).

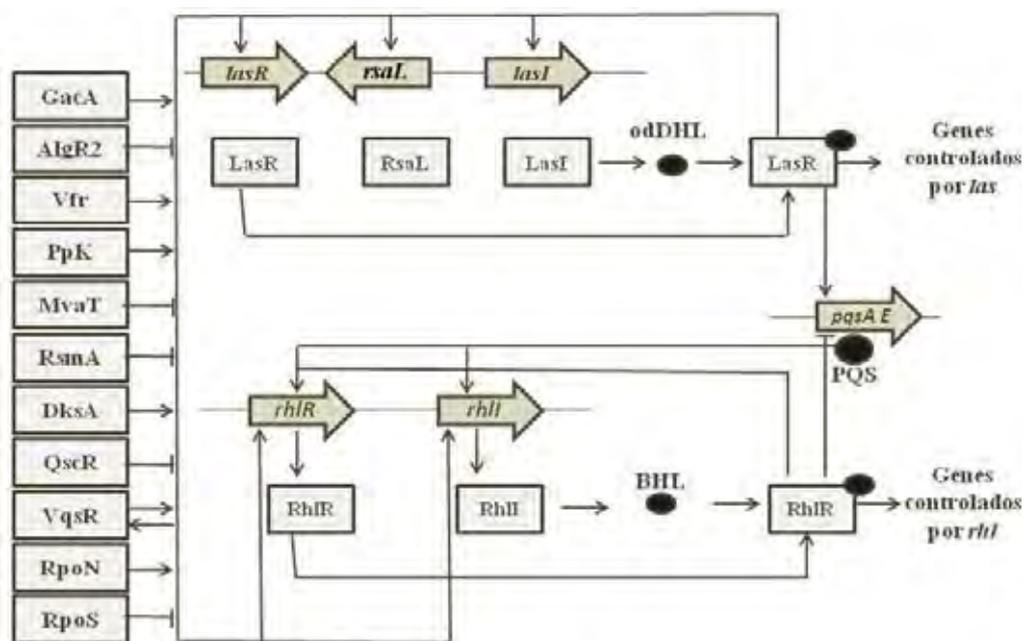


**Figura 5** - Cascata Regulatória envolvendo LasR e RhIR e seus autoindutores (LATIFI *et al.*, 1996- modificado).

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, RhIR ativa funções específicas controladas por LasR, como 3-oxo-C<sub>12</sub>-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.

A complexidade da rede de regulação gênica envolvida na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* é um importante problema para a construção de linhagens com aumento da produção destes biossurfactantes. Os circuitos de quorum sensing las e rhl são controlados por reguladores adicionais que ajustam as respostas desses sistemas, através de uma modulação compensatória (Fig. 6) (JUHAS *et al.*, 2005).



**Figura 6** - Circuito regulatório dos sistemas de quorum sensing em *Pseudomonas aeruginosa* (ativação  $\longrightarrow$ , inibição  $\longleftarrow$ ). -odDHL- dodecanoil homoserina lactona; BHL- butanoil homoserina lactona e PQS – *Pseudomonas* quinolona sinal. (JUHAS *et al.*, 2005)

## 1.2 Produção de Biossurfactantes

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos devido a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações. Apesar das vantagens apresentadas, os biotensoativos não são amplamente utilizados comercialmente devido aos altos custos de produção, o que está associado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros.

De acordo com Mukherjee *et al.*, (2006) três estratégias devem ser adotadas para tornar os custos do processo de produção mais baixo: (1) substrato - utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo; (2) desenvolvimentos de bioprocessos eficientes para

produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo e (3) desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante.

### **1.2.1 Substratos alternativos/ Resíduos**

A utilização de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo tais como subproduto agrícola ou de processamento industrial pode reduzir o problema econômico da produção de biossurfactantes. Estima-se que a matéria-prima seja responsável por cerca de 10 – 30% dos custos totais de produção em muitos processos biotecnológicos (MUKHERJEE *et al.*, 2006). Além disto, o aproveitamento de resíduos pode contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados.

Grandes quantidades de resíduos são geradas pela indústria de óleos e gorduras, estes são provenientes tanto da extração como da utilização de óleos vegetais. Estudos demonstraram que resíduos de óleos vegetais podem ser utilizados como substratos para a produção de ramnolipídios por alguns isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (BENINCASA *et al.*, 2002; NITSCHKE *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2005; RAZA *et al.*, 2007).

Alguns autores relatam ainda a utilização de melão de cana, resíduos da produção de queijo, batata e mandioca como fontes para a produção de biotensioativos (MUKHERJEE *et al.*, 2006). Outra fonte alternativa é o glicerol, um dos principais subprodutos obtidos durante a produção de biodiesel.

A água de maceração de milho é um subproduto do processamento dos grãos de milho, é um material ácido, rico em aminoácidos e polipeptídios, minerais e vitaminas. Devido à sua composição pode ser utilizado como suplemento de nutrientes em meio de cultivo para fermentações industriais (LIGGETT & KOFFLER, 1948).

### **1.2.2 Fatores que influenciam a produção**

A produção de biossurfactantes se depara com várias dificuldades de processo. 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, geração de espuma, temperatura e pH (FIECHTER, 1992; CHANG *et al.*, 2005).

Elevadas proporções C/N (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; RAZA *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2007) e C/P (MULLIGAN *et al.*, 1989) estimula a síntese de ramnolipídios, enquanto altas concentrações de cátions bivalentes, especialmente ferro, são inibitórias (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986; VENKATA-RAMANA E KARANTH, 1989). Benincasa e Accorsini (2008) avaliaram a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI sob diferentes proporções C/N e alcançaram a mais alta concentração, 7,3 g/L, com a proporção C/N de 8/1. A utilização de  $\text{NH}_4^+$ , glutamina, asparagina e arginina, como fonte de nitrogênio, inibem a produção de ramnolipídios, enquanto  $\text{NO}_3^-$ , glutamato e aspartato promovem a síntese (MULLIGAN e GIBBS, 1989; VENKATA, RAMANA E KARANTH, 1989; KÖHLER *et al.*, 2000). De acordo com alguns autores o nitrato é a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada, pois estimula uma alta expressão de *rhlAB*, operon responsável pela síntese de mono-ramnolipídios (VENKATA, RAMANA E KARANTH, 1989; MANRESA *et al.*, 1991; ARINO *et al.*, 1996 e HENNING *et al.*, 2008). De acordo com Manresa *et al.* (1991) a preferência por esta fonte de nitrogênio pode ser devido ao fato de *P. aeruginosa* ser apta a fazer desnitrificação e, portanto pode utilizar nitrato como aceptor de elétrons, mesmo na presença de oxigênio.

Fatores ambientais e condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio afetam a produção de biossurfactantes, interferindo no crescimento e na atividade celular (DESAI e BANAT, 1997). A produção de ramnolipídios por *Pseudomonas* sp. foi máxima quando o pH foi mantido entre 6 e 6,5; já acima de 7, 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.*, 1985).

Durante a produção por leveduras, a produção de biossurfactantes 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 surfactina por *B. subtilis*.

A formação de espuma durante a produção de biossurfactante em biorreator é um dos grandes problemas enfrentados. Já que não se pode descartar o excesso de espuma,

pois neste conteúdo há biossurfactante, células e nutrientes. Há situações em que é necessária a interrupção da fermentação, antes do período estabelecido, acarretando em um menor rendimento. Na tentativa de diminuir a formação de espuma, Adamczak e Bednarski, (2000) adicionaram 4% de óleo de soja após 48 e 96 horas de cultivo, porém houve queda na produção de 45 para 28 g/L.

### **1.2.3 Produção de biossurfactante por micro-organismos mutantes**

A genética do micro-organismo é um fator importante que afeta diretamente o rendimento de produtos biotecnológicos, pois a capacidade de sintetizar metabólitos é determinada pelos genes do micro-organismo.

O sucesso da produção comercial de bioprodutos é dependente do uso de linhagens microbianas com capacidade para sintetizar elevadas concentrações do composto, estes elevados rendimentos podem ser obtidos a partir de linhagens mutantes ou recombinantes (MUKHERJEE *et al.*, 2006).

Em relação à produção de biossurfactante constatou-se que com a utilização de linhagens mutantes ou recombinantes foi possível a obtenção de melhores rendimentos. Segundo Tahzibi *et al.*, (2004), a produção de ramnolipídios foi 10 vezes mais alta ao utilizar *P. aeruginosa* PTCC 1637 geneticamente modificada através de mutação randômica. O mesmo tipo de mutação foi utilizado para modificar *Bacillus licheniformes*, e constatou-se uma melhora na produção de biossurfactante, alcançando um rendimento 12 vezes mais elevado (LIN *et al.*, 1998).

A utilização de linhagens altamente produtoras, associado ao uso de substratos de baixo custo e condições adequadas de cultivo impulsionará o processo de produção industrial de biossurfactantes, tornando possível a sua comercialização.

## **1.3 Aplicações**

Os campos de utilização dos biossurfatantes incluem a agricultura, indústrias farmacêutica, petrolífera, de alimentos e bebidas, de papel, de metal, de produtos de limpeza, de couro e têxtil (FIECHTER, 1992). São imensamente aplicados pela indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações

de óleos lubrificantes, assim como em biorremediação e dispersão no derramamento de óleo.

O biossurfactante pode ser adicionado ao local onde há contaminação por petróleo e derivados ou ainda o micro-organismo produtor inoculado na área impactada. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de metabolizar querosene, óleo Diesel e petróleo bruto como única fonte de carbono. A mais alta concentração de ramnolipídio, 9,9 g/L, foi alcançada com 30% de óleo Diesel (PIRÓLLO *et al.*, 2008)

De acordo com Wang & Mulligan, (2009), biossurfactantes podem ser úteis na remoção de arsênico de rejeitos da mineração. Outra aplicação é a remoção de cromo (VI) da água e do solo, Ara & Mulligan (2008) relataram que houve retirada de 100% deste metal da água quando se estabeleceu condições físico-químicas ótimas, como: pH 6,0; solução com 2% de ramnolipídios e temperatura de 25°C.

Remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo também fazem parte dessa gama de aplicações. Além da remoção de hidrocarbonetos os ramnolipídios são efetivos também na remoção de metais ou mistura de ambos de locais contaminados (MULLIGAN, 2005). De acordo com Wei *et al.*, (2005) os biossurfactantes podem atuar na recuperação de adsorventes de óleos usados, dessa maneira este material pode ser reutilizado na recuperação de óleo ou em outras aplicações, como a engenharia civil.

Um estudo realizado por Qiuzhuo *et al.*, (2008) comprovou a eficiência dos ramnolipídios na decomposição de palha de arroz, aumentando em 22,3% a produção de açúcares redutores quando se adicionou biossurfactante purificado ao meio de sacarificação hidrolítica. Foi avaliado também o efeito da inoculação de *P. aeruginosa* para produção *in situ* do tensoativo, e a quantidade de açúcares redutores produzido foi 12,2% maior quando comparado ao controle (sem adição da bactéria), lembrando que este segundo método omite a etapa de purificação, reduzindo os custos do processo.

Os biotensoativos possuem propriedade antiadesiva, que impede a formação de biofilmes patogênicos em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções hospitalares sem a utilização de drogas sintéticas (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Os ramnolipídios podem atuar ainda como antimicrobianos, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral (ABALOS *et al.*, 2001). Thanomsub *et al.*, (2007), relataram a inibição do crescimento de células cancerosas humanas pelos homólogos de ramnolipídios, Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12</sub>, produzidos por *P. aeruginosa* B189. Ainda dentro das aplicações

na indústria farmacêutica há relatos de que a incorporação de 0,1% de di-ramnolipídios em pomadas aumentou a eficiência do tratamento de úlceras de pacientes decúbitos (PILJAC et al., 2008).

Wang et al., (2005) verificaram que a mistura de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* tem efeito potencial algicida, inibindo o crescimento de *Heterosigma akashiwo* e quando em altas concentrações apresentam forte atividade lítica.

Na agroindústria, os ramnolipídios atuam na proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinérea*, através da inibição da germinação de esporos e crescimento do micélio fúngico (VARNIER et al., 2009). Soluções contendo 0,01% de ramnolipídios estimularam o sistema imune de plantas contra fungos patogênicos (NITSCHKE et al., 2011).

Nitschke et al., (2011) em sua revisão descrevem aplicações de ramnolipídios em diferentes áreas da indústria alimentícia, onde podem atuar como controladores de consistência, solubilizadores de sabor, na conservação de produtos da panificação, e ainda em conjunto com nisina e natamicina inibem o crescimento microbiano em leite de soja, molhos de salada e queijo cottage. Além disso, os autores descrevem o retardo na formação de biofilme em superfícies tratadas com ramnolipídios.

O interesse na síntese biológica de nanopartículas tem aumentado devido à sua excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade. Os ramnolipídios estão sendo empregados na formação e estabilização de nanopartículas de óxido de níquel e zircônia e prata (MULLIGAN, 2009; PALANISAMY; RAICHUR, 2009; GANESH et al., 2010). As nanopartículas de ramnolipídios e prata exibiram atividade antibiótica contra patógenos Gram positivos/ negativos e leveduras *Candida albicans*, evidenciando o amplo espectro de ação da sua atividade antimicrobiana (GANESH et al., 2010).

Recentemente foi descrito por Zhang e Ju (2011) a utilização de ramnolipídios para separação de  $\beta$ -glicosidase de uma mistura de enzimas através do fracionamento de espuma. Os ramnolipídios foram utilizados devido a sua propriedade espumante e pela presença de di-ramnose em alguns homólogos, a qual atua como um substrato análogo para a  $\beta$ -glicosidase.

## **2. OBJETIVOS**

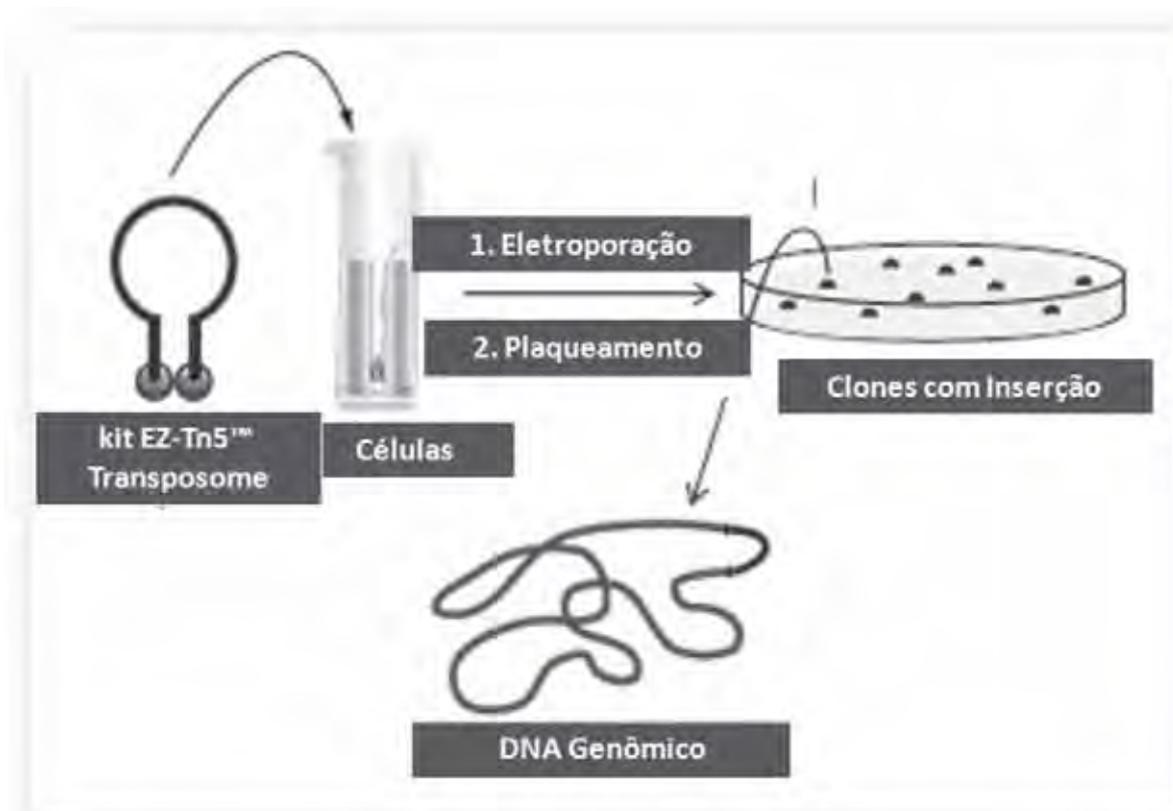
### **2.1- Geral**

- Estudar a produção de ramnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa* LBI a partir de resíduos industriais e óleos vegetais.

### **2.2- Específicos**

- Obtenção de um banco de mutantes de *P. aeruginosa* LBI, via mutação randômica;
- Verificar a potencialidade dos mutantes para produção de ramnolipídios frente aos substratos propostos (soapstock de óleos produzidos pela agroindústria, óleo de mamona e girassol), bem como selecionar clones com elevada produção de biossurfactante;
- Produção em biorreator, visando o aumento da produção de ramnolipídios;
- Avaliar o efeito de aparato mecânico na quebra de espuma em reator de 42 litros
- Caracterizar os biossurfactantes obtidos quanto a sua composição e propriedades físico-químicas.

**3. CAPÍTULO I**  
**MUTAÇÃO RANDÔMICA E SELEÇÃO INICIAL DE CLONES PRODUTORES**  
**DE RAMNOLIPÍDIOS**



### 3.1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos que apresentam atividade superficial e são sintetizados por uma grande variedade de micro-organismos (BANAT *et al.*, 2000; DESAI; BANAT, 1997). A maior vantagem destes compostos quando comparado aos surfactantes sintéticos reside na sua diversidade estrutural, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade. Os tensoativos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* são glicolipídios, denominados rhamnolipídios, cuja porção hidrofílica é composta por moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico. A produção destes compostos por bactérias deste gênero foi primeiramente descrita por Jarvis *et al* (1949).

Devido às suas propriedades tensoativas, esses detergentes biológicos podem ser aplicados em diferentes processos industriais, como produção de fármacos, compostos químicos, cosméticos, biorremediação de ambientes poluídos por petróleo e derivados e recuperação terciária do petróleo (BANAT *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2007).

Apesar das vantagens apresentadas, os biossurfactantes não são amplamente utilizados pelas indústrias devido ao alto custo de produção. A utilização de substratos mais baratos, associado à otimização das condições de cultivo e ao desenvolvimento de linhagens mutantes ou recombinantes pode levar à substituição dos surfactantes sintéticos por aqueles de origem biológica (MUKHERJEE *et al.*, (2006).

O desenvolvimento de linhagens altamente produtoras através de mutação ou recombinação gênica tem sido adotado por diferentes autores e os resultados obtidos foram muito promissores. O aumento na produção de biossurfactante variou de 2 até 12 vezes. Os mutantes podem ser produzidos através da utilização de diferentes agentes, como inserção de transposons (KOCH *et al.*, 1991), mutagênicos químicos (TAHZIBI *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 1998), físicos (IQBAL *et al.*, 1995; MULLIGAN e GIBBS, 1989) entre outros.

A manipulação genética de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* exige a transposição de obstáculos, já que a maioria dos procedimentos genéticos utiliza cassetes de resistência a antibióticos como indicador da transformação e esta bactéria Gram negativa tem mostrado resistência às diversas classes de antibióticos existentes (BAGGE *et al.*, 2004). A resistência de *P. aeruginosa* esta associada a uma baixa permeabilidade da

membrana externa a esses compostos, além de mecanismos eficientes de extrusão dos antimicrobianos através de bombas de efluxo (LI et al., 2000).

Nesta etapa do estudo avaliou-se a resistência da linhagem de *P. aeruginosa* LBI frente a diferentes concentrações do antibiótico canamicina e depois de estabelecido a dose adequada do antibiótico, prosseguiu-se com o processo de transformação para obtenção do banco de mutantes, que foi previamente analisado quanto ao seu potencial para produzir ramnolipídios.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Micro-organismos**

A partir da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI, obteve-se um banco de mutantes construído pela inserção de transposon. Os micro-organismos foram mantidos acondicionados em tubos criogênicos a -20°C.

#### **3.2.1.1 Teste de Resistência à Antibióticos**

Foram avaliados os seguintes antibióticos: cloranfenicol (25 µg/ml), estreptomicina (10 µg/ml), ácido nalidíxico (10 µg/ml) e tetraciclina (10 µg/ml). A canamicina foi avaliada nas concentrações 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 µg/ml. As soluções dos referidos antibióticos foram previamente preparadas e os mesmos adicionados ao meio de cultivo (LB) após este atingir temperatura em torno de 40°C. Em seguida o meio foi distribuído em placas e a linhagem de *P. aeruginosa* LBI foi inoculada por dois métodos: espalhamento em superfície e estriamento. As placas foram mantidas em estufa à 30°C por 24 horas e após este período foram avaliadas para verificar o crescimento do micro-organismo. As análises foram feitas em triplicata.

#### **3.2.1.2 Obtenção de mutantes randômicos para estirpe de *Pseudomonas aeruginosa*.**

O banco de mutantes randômicos para linhagem isolada de solo contaminado por petróleo (BENINCASA et al., 2002) foi construído usando o kit EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre).

##### **3.2.1.2.1 Cultivo da linhagem selvagem**

A linhagem de *P. aeruginosa* LBI foi previamente inoculada em 5 mL de Luria Bertani (LB) e mantida sob agitação de 200 rpm, 30°C, por um período de 15 horas. Em

seguida esta suspensão foi inoculada em 250 mL de LB, e o cultivo foi feito sob as mesmas condições de temperatura e agitação acima citados. Após atingir uma densidade óptica de 0,5, o equivalente a uma população de  $10^8$  UFC/mL, estas foram preparadas para transformação (células competentes).

#### **3.2.1.2.2 Preparação das Células para Eletroporação**

As células foram lavadas três vezes com glicerol 10% gelado. O volume de glicerol utilizado na primeira e segunda lavagem foi 250 e 125 mL, respectivamente e os parâmetros adotados para a centrifugação foram 10 minutos, 4°C e 4000 rpm. A terceira lavagem foi feita com 1 mL de glicerol 10% por 2 minutos, 4°C e 13.000 rpm. A cada nova adição de glicerol o pellet foi dissolvido lentamente, através de agitação manual. As células e todo o material utilizado durante este procedimento foram mantidos no gelo.

Uma alíquota de 100µL das células lavadas com glicerol, resultante da terceira lavagem, foi utilizada para o procedimento de transformação. Para a eletroporação adicionou-se às células 1 µL do transposon EZ-Tn5 <KAN- e as condições utilizadas foram 2,5 kV, 200Ω, 25µF. Após o choque colocou-se 1 mL de LB e as células foram mantidas em mesa agitadora por 1 hora, a 28°C e 200 rpm. Em seguida diluiu-se duas vezes e a suspensão resultante foi plaqueada em LB contendo 600 e 700 µg/mL de canamicina, o volume de inóculo adicionado foi 200 µL em cada placa, que foi incubada em B.O.D a 30°C até surgimento das colônias, que correspondeu ao número de mutantes obtidos.

Para o aumento na densidade celular as colônias foram repicadas em placas contendo LB/ canamicina. Após o crescimento, inoculou-se os mutantes em tubos estéreis contendo 2 mL de LB e 300 µg/mL de canamicina, os quais foram mantidos sob agitação por 24 horas, a 30°C e 200 rpm, em seguida adicionou-se 600 µL de glicerol estéril em cada tubo e armazenou-se a -20 °C para posterior avaliação dos transformantes de interesse.

#### **3.2.2 Seleção dos Mutantes de Interesse**

O objetivo da construção deste banco randômico foi selecionar clones com elevada produção de ramnolipídios. Assim, os clones foram individualmente inoculados em meio “Blue Agar” (SIEGMUND e FRITZ, 1991) para detecção de glicolipídios extracelulares. Os mutantes foram inoculados em LB e mantidos em agitação por 36 horas à 200 rpm e

30°C. Colocou-se 30µL de suspensão correspondente a cada mutante nas placas contendo “Blue Ágar”, para verificar a formação do halo referente à produção de glicolipídios. Os clones selecionados foram avaliados quanto a sua potencialidade em aumentar a produção de ramnolipídios a partir de resíduos provenientes da indústria de óleos vegetais.

### **3.2.3 Meios de cultura e condições de cultivo**

#### **3.2.3.1 Meios de cultura**

##### **3.2.3.1.1 Sais de Robert (SR)**

Para a produção de biossurfactante foi utilizado como base o meio de cultivo salino descrito por Robert et al. (1989), composto por (g/L): NaNO<sub>3</sub>, 4,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5; KCl, 0,1; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01; CaCl<sub>2</sub>, 0,01; extrato de levedura, 0,01 e 0,05 mL/L de solução de elementos traços contendo boro (0,026%), cobre (0,05%), manganês (0,05%), molibdênio (0,006%) e zinco (0,07%). As fontes de carbono avaliadas foram óleo de mamona, borra de óleo de soja, de algodão e de milho, adicionadas na concentração de 2% (p/v).

O pH inicial do meio foi ajustado, com HCl 2 N/ NaOH 2N, para 6,8. Todo material utilizado nos ensaios fermentativos foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

##### **3.2.3.1.2 Caldo Nutriente (CN) e Luria Bertani (LB)**

A composição dos meios utilizados para o pré-cultivo dos micro-organismos em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona - 10; extrato de levedura - 5,0 e NaCl - 10 (LB).

#### **3.2.3.2 Condições de cultivo**

##### **3.2.3.2.1 Inóculo**

O inóculo foi preparado a partir dos tubos de cultura estoque, onde 2% (v/v) de cada mutante foi adicionado a tubos de ensaio contendo caldo nutriente, em seguida os mesmos foram incubados durante 24 horas a 30 °C e 200 rpm. Após este período foram realizadas leituras de absorvância a  $\lambda = 600$  nm (Espectrofotômetro SHIMADZU UV-

1601PC) e diluições, com solução salina 0,85% (p/v) estéril, para padronização da Densidade Óptica (D.O.) =  $0,70 \pm 0,02$ . Após a padronização do inóculo, 4% (v/v) desta solução foi transferida para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio salino e 2% (p/v) da fonte de carbono (óleo de mamona ou resíduos do processamento de óleo de soja, milho ou algodão), os tubos permaneceram sob agitação por 24 horas, à 200 rpm e 30 °C.

#### **3.2.3.2.2 Experimentos em tubos de ensaio**

As fermentações para a seleção dos mutantes foram conduzidas em tubos de ensaio para melhor aproveitamento de espaço e tempo. A cada fermentação foram avaliados 24 mutantes e o controle (*P. aeruginosa* LBI), os experimentos foram feitos em duplicata. A cada tubo de ensaio foi adicionado 5 mL de meio salino acrescido de 2% (p/v) da fonte de carbono (óleo de mamona, resíduo do processamento de óleo de algodão, milho ou soja) e 4% (v/v) de inóculo. Os tubos foram mantidos por 72 horas, à 200 rpm e 30°C. Ao final das fermentações foram realizadas análises para quantificar o ramnolipídio produzido.

#### **3.2.4 Métodos Analíticos**

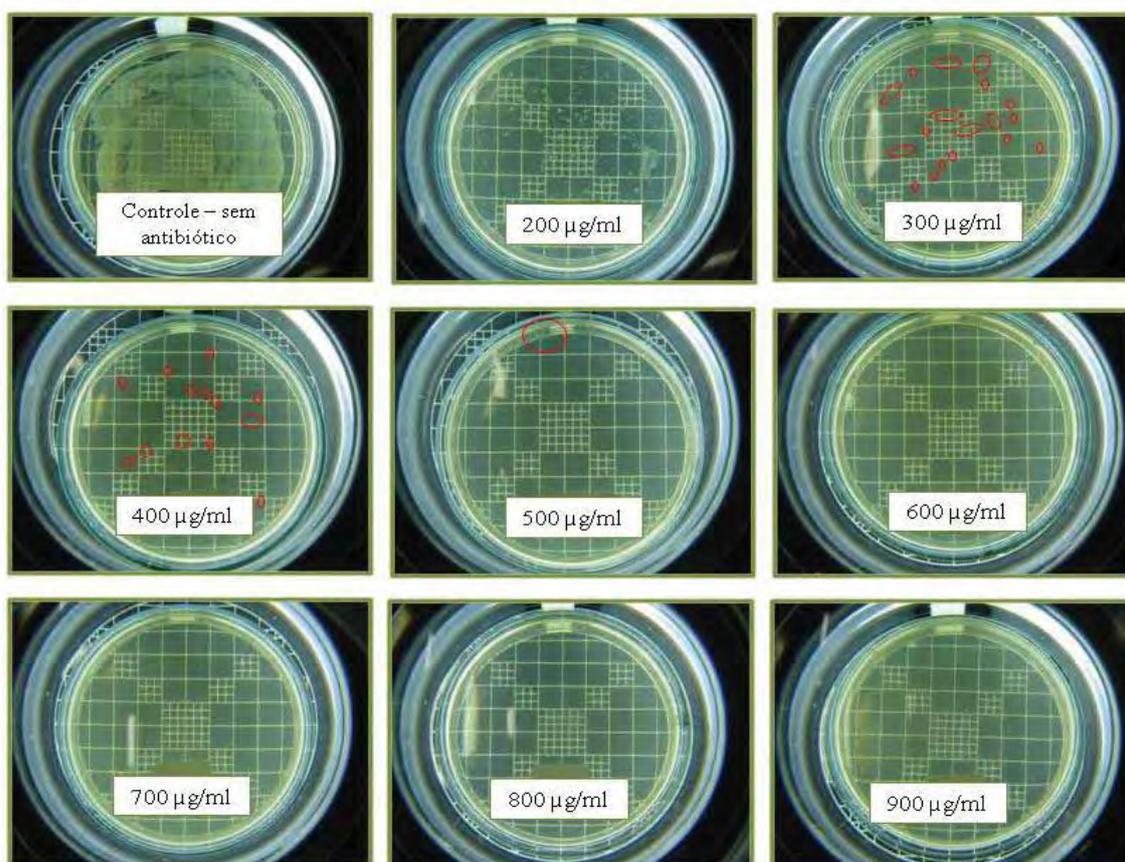
##### **3.2.4.1 Determinação da concentração de ramnose**

A concentração de ramnose foi determinada pelo método descrito por Chandrasekaran e Bemiller (1980), para análise de 6-desoxihexose. Adicionou-se 4,5 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, composta por 90 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 15 mL de água destilada, a 1 mL de amostra, constituída pelo caldo livre de células. Os tubos contendo a mistura foram agitados e levados ao banho à 100°C por 10 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL de solução de ácido tioglicólico (0,1 mL de ácido tioglicólico e 2,9 mL de água destilada - preparada no momento da utilização); os tubos foram homogeneizados e mantidos sob ausência de luz por três horas. Após este período realizou-se a medida de absorbância nos comprimentos de onda de 400 e 430 nm. A concentração de ramnose foi determinada colocando-se o valor de absorbância, obtido da diferença entre os dois comprimentos de onda, em uma curva de calibração, previamente determinada com ramnose comercial. As análises foram conduzidas em triplicata.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Teste de resistência a antibióticos

Primeiramente foram realizados testes com diferentes antibióticos, visando encontrar algum cuja presença inibisse o crescimento da bactéria. Os antibióticos e as respectivas concentrações foram cloranfenicol (25  $\mu\text{g/mL}$ ), estreptomicina (10  $\mu\text{g/mL}$ ), ácido nalidíxico (10  $\mu\text{g/mL}$ ), tetraciclina (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e canamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados obtidos foram negativos, pois houve intenso crescimento da linhagem avaliada. Pode ser que *Pseudomonas aeruginosa* LBI seja sensível a alguns dos antibióticos avaliados, porém em maior concentração do que as utilizadas neste teste.



**Figura 3.1** - Teste de resistência a canamicina por *P. aeruginosa* LBI. As concentrações do antibiótico variaram de 200 a 900  $\mu\text{g/ml}$ . Na placa controle não foi adicionado antibiótico. Marcações em vermelho indicam a presença de colônias.

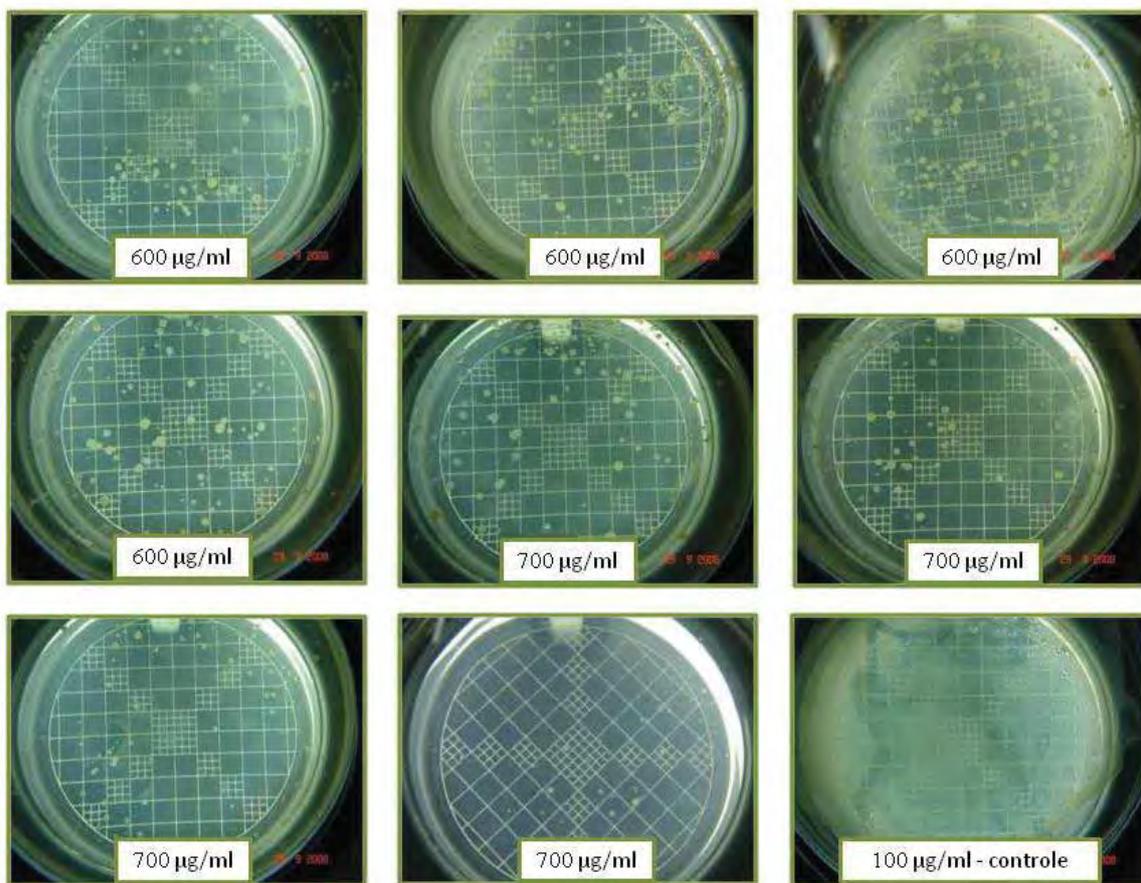
Como o foco do trabalho era a utilização do kit de mutação randômica, cujo marcador era o gene de resistência à canamicina, avaliou-se o crescimento de *P. aeruginosa* LBI em concentrações variando de 100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . O crescimento foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do antibiótico. Em concentrações acima de 600  $\mu\text{g/mL}$  não foi observado formação de colônias (Fig. 3.1). Com estes

resultados optou-se por fazer o plaqueamento dos mutantes em meio contendo 600 e 700 µg/mL do antibiótico.

A canamicina é um bacteriostático que pertence à classe dos aminoglicosídeos, ela age impedindo a síntese de proteínas pela bactéria. A resistência à aminoglicosídeos em *P. aeruginosa* normalmente resulta da inativação da droga por enzimas codificadas pelo DNA plasmidial/ cromossomal ou por elementos transponíveis como os transposons ou integrons (SMITH E BAKER, 2002). Outros fatores que possibilitam a resistência são: impermeabilidade causada pela baixa captação do antibiótico (TURNIDGE, 2003); resistência adaptativa que se desenvolve após poucas horas de exposição à droga, sendo perdida na ausência da mesma (KARLOWSKY *et al.*, 1997); sistema de efluxo, onde ocorre um sistema antiporte de bombeamento do antimicrobiano (POOLE, 2004) e modificação de lipopolissacarídeo, o que impossibilita o influxo do antibiótico (RIVERA *et al.*, 1988). Seja qual for a estratégia adotada pela linhagem esta não foi eficiente em inativar, impedir o influxo ou ainda bombear extracelularmente o antibiótico em concentrações acima de 600 µg/ml.

### **3.3.2 Mutação Randômica**

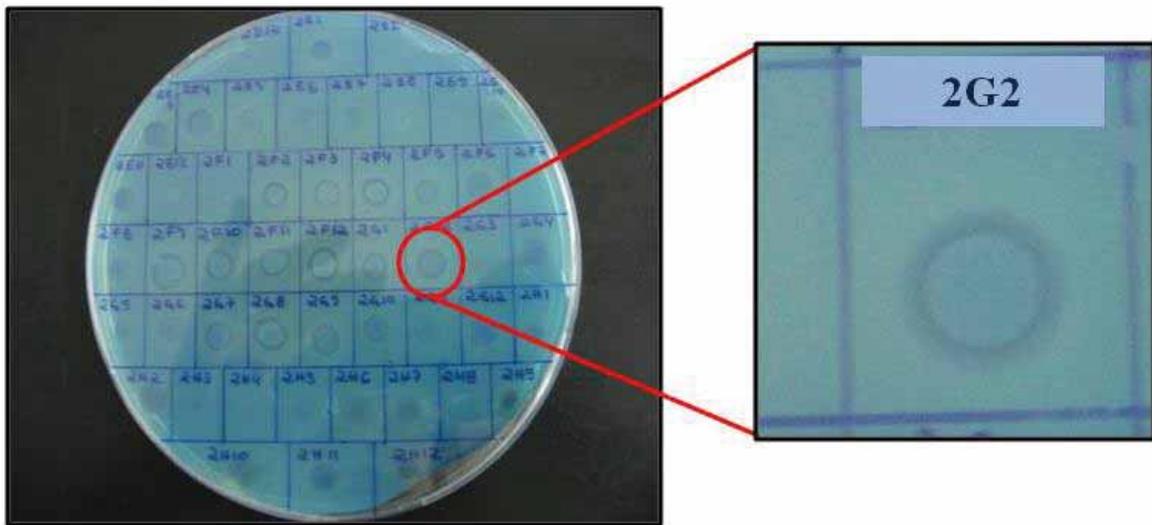
A mutação randômica foi feita com o intuito de se obter mutantes com capacidade de produzir elevadas concentrações de ramnolipídios, após o processo de eletroporação o número de clones obtidos foi 760. Os mutantes foram plaqueados e os resultados podem ser visualizados na Figura 3.2. Na placa controle observa-se que não ocorre formação de colônias isoladas, não sendo possível o isolamento de mutantes, comprovando a necessidade de concentrações elevadas do antibiótico.



**Figura 3.2** - Colônias obtidas após o processo de eletroporação. Placas com 600 e 700 µg/ml de canamicina; controle – 100 µg/ml

### 3.3.3 Mutantes com potencial para produção de ramnolipídios

Todos os mutantes obtidos (760) foram avaliados quanto ao seu potencial em produzir ramnolipídios, já que este poderia ter sido perdido após a inserção do transposon. Dentre todos os clones avaliados não houve formação de halo em 120 mutantes, 36 não cresceram e 604 formaram o halo correspondente a produção de glicolipídio. De acordo com Siegmund e Fritz (1991) o ramnolipídio forma um par iônico insolúvel com o brometo de cetiltrimetilamonônio (CTAB) e o com o azul de metileno, formando então o halo azul escuro em torno da colônia produtora (Fig. 3.3).



**Figura 3.3** - Halo formado pela produção de ramnolipídio pelo mutante 2G2.

### 3.3.4 Experimentos em tubos de ensaio – Screening

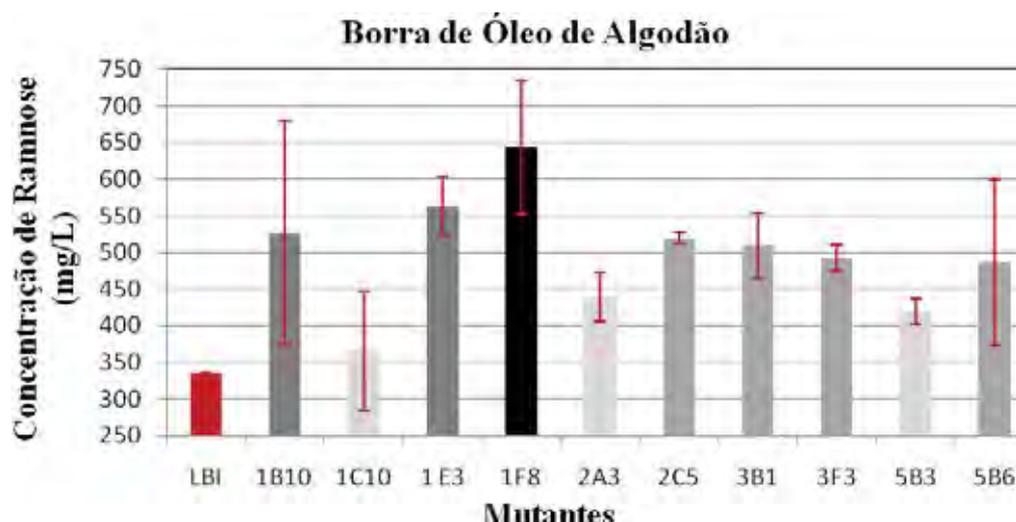
O banco de mutantes era inicialmente constituído por 760 micro-organismos, porém 120 não formaram halo no teste de Blue Ágar e 87 perderam a viabilidade, portanto o número total de mutantes avaliados foi 553.

Nesta primeira etapa os mutantes com potencial para produção de biossurfactante foram avaliados frente à quatro fontes de carbono. Os resultados apresentados abaixo compreendem as linhagens com maior produção dentre todos os avaliados em cada fonte de carbono.

#### 3.3.4.1 Borra de Óleo de Algodão

Como pode ser observado na Fig. 3.4, foram selecionados dez mutantes com indícios de serem melhores produtores de ramnolipídios do que *P. aeruginosa* LBI.

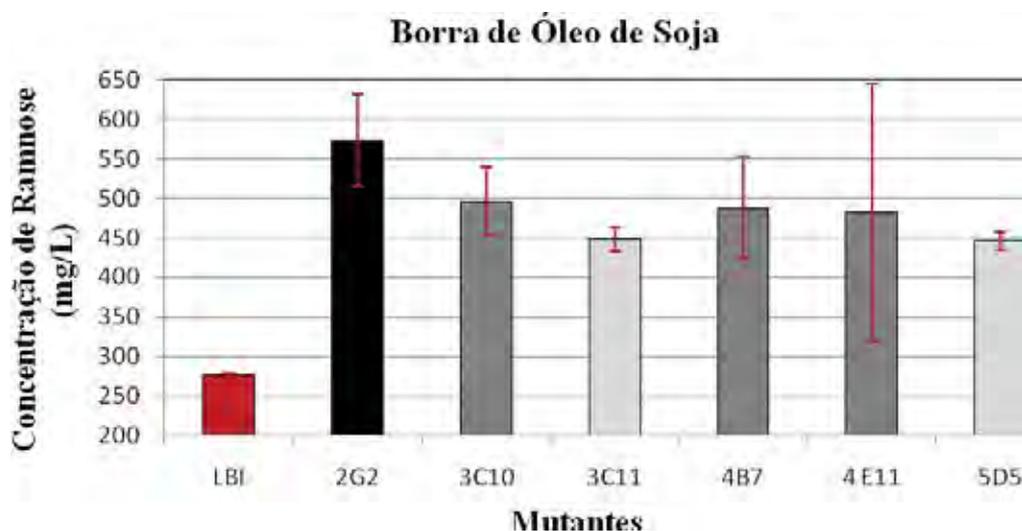
Com esta fonte de carbono as maiores produções, em relação à linhagem selvagem, foram alcançadas pelos mutantes *P. aeruginosa* LBI **1F8**, **1E3** e **1B10**, os aumentos foram de 92; 68,4 e 57,4%, respectivamente. O menor aumento na produção foi de 9% obtido com a linhagem *P. aeruginosa* LBI 1C10.



**Figura 3.4** - Produção de ramnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa* LBI, utilizando borra de óleo de algodão como fonte de carbono.

### 3.3.4.2 Borra de Óleo de Soja

Ao utilizar borra de óleo de soja como fonte de carbono, foram selecionados seis mutantes que apresentaram produções superiores à linhagem selvagem (Figura 3.5).



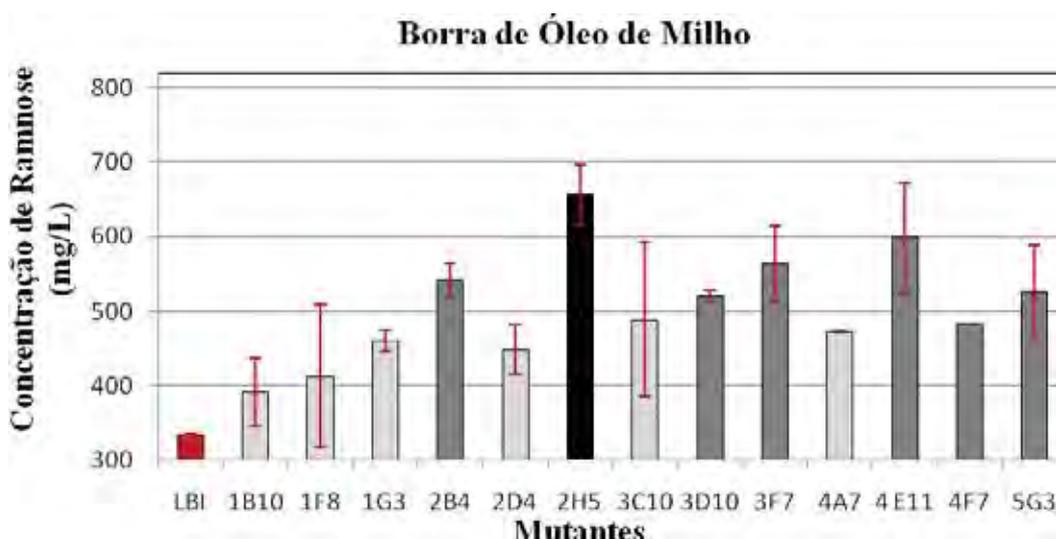
**Figura 3.5** - Produção de ramnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa* LBI, utilizando borra de óleo de soja como fonte de carbono.

A linhagem *P. aeruginosa* LBI **2G2**, foi a que apresentou o maior aumento na porcentagem de produção de ramnolipídios (107,5%). Os demais mutantes exibiram aumento na síntese do biossurfactante que variou entre 61 e 79%. Vale ressaltar que o resultado apresentado pelo clone **4E11** é acompanhado por um desvio padrão bastante

grande, porém o menor valor de produção alcançado por este micro-organismo ainda é 33% superior à *P. aeruginosa* LBI.

### 3.3.4.3 Borra de Óleo de Milho

Nos estudos realizados utilizando borra de óleo de milho como única fonte de carbono, foi possível selecionar treze mutantes com potencial para uma alta produção do tenso-ativo de interesse (Figura 3.6).

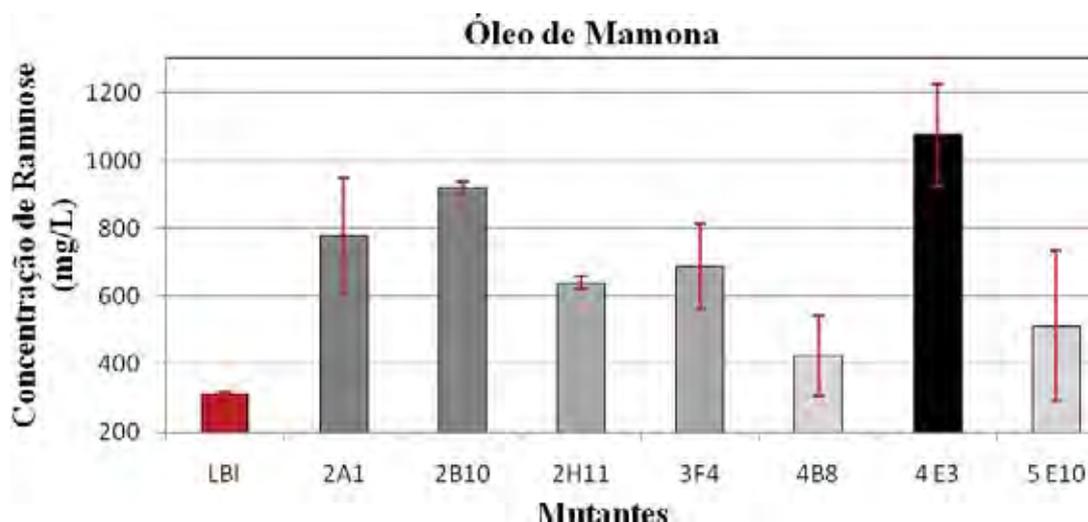


**Figura 3.6** - Produção de ramnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa* LBI, utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono.

As maiores produções foram alcançadas por *P. aeruginosa* LBI **2H5** e **4E11**, com aumento na produção de 97 e 79,4%, respectivamente. O clone com menor aumento na síntese, quando comparado à estirpe selvagem, foi o **1B10** (17%).

### 3.3.4.4 Óleo de Mamona

A análise da produção de ramnolipídios pelos mutantes utilizando óleo de mamona como fonte de carbono, permitiu a seleção de sete mutantes, dentre os 553 avaliados (Figura 3.7).



**Figura 3.7** - Produção de ramnolipídios por mutantes de *P. aeruginosa* LBI, utilizando óleo de mamona como fonte de carbono.

As linhagens **2A1**, **2B10** e **4E3** se destacaram quanto à produção do biosurfactante, pois após 72 horas de Fermentação alcançaram as respectivas concentrações de 777,3; 920 e 1076,2 mg/L de ramnose, enquanto *P. aeruginosa* LBI produziu 312,5 mg/L. A variação no aumento da produção do tensoativo para as linhagens selecionadas foi de 36 a 344%.

Houve mutantes que se destacaram em duas fontes de carbono, as linhagens **3C10** e **4E11** alcançaram concentrações de ramnose mais elevadas do que a linhagem selvagem, tanto em borra de óleo de soja como em borra de óleo de milho; já os mutantes **1B10** e **1F8** se destacaram nas borras de algodão e milho.

**4. CAPÍTULO II**  
**FERMENTAÇÃO EM FRASCO – SELEÇÃO DE MUTANTES COM ALTA**  
**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS**



## 4.1 INTRODUÇÃO

A genética do micro-organismo é um fator importante que afeta diretamente o rendimento de produtos biotecnológicos, pois a síntese desses metabólitos é determinada pela expressão de proteínas que tanto podem ativar como inibir a produção dos mesmos. Em relação à produção de biossurfactante constatou-se que com a utilização de linhagens mutantes ou recombinantes foi possível a obtenção de melhores rendimentos. O emprego de mutação randômica em linhagens de *P. aeruginosa* PTCC 1637 e *Bacillus licheniformes* acarretou em um aumento na produção de biossurfactante de dez e doze vezes, respectivamente (TAHZIBI et al., 2004; LIN et al., 1998).

A produção de ramnolipídios por linhagens mutantes de *P. aeruginosa* associada à utilização de fontes alternativas de nutrientes é uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento industrial da produção de ramnolipídios. Os resíduos provenientes tanto da extração como da utilização de óleos e gorduras pela indústria de alimentos são exemplos de substratos hidrofóbicos que podem ser utilizados para produção de biossurfactante (NITSCHKE et al 2005).

A borra de óleo (soapstock) é um co-produto da indústria de refino de óleos vegetais, sendo formado no início do processamento do óleo cru, pela reação de ácidos graxos com hidróxido de sódio. Esse material contém ácidos graxos, esteróis, fosfato, carboidratos e poli-álcoois como o glicerol (DOWD, 1998). A composição associada às características hidrofóbicas e ao baixo custo desse resíduo o torna adequado para ser utilizado como fonte de carbono para a produção de glicolipídios por *P. aeruginosa*, pois o acúmulo de ramnolipídios, em meio contendo óleos vegetais e resíduos provenientes do seu processamento, é superior ao obtido com fontes de carbono hidrofílicas (ROBERT et al., 1989).

O óleo de mamona não é conveniente para o consumo humano e pode ser uma fonte alternativa para a produção de biossurfactante. O principal componente desse óleo é o ácido ricinoléico - ácido 12-hidroxi-9-octadecenóico (PIAZZA e FARRELL, 1991). A presença de grupos carboxil, hidroxil e insaturações em sua estrutura, permite a sua utilização em diversas reações para formação de produtos que podem substituir àqueles oriundos do petróleo (GOSWAMI et al, 2010).

De acordo com Guerra-Santos et al., (1984) a fonte de carbono utilizada é um dos principais fatores que influenciam a composição e distribuição de homólogos em uma mistura de ramnolipídios. Portanto, o emprego de diferentes resíduos para produção de

biossurfactante, além de reduzir os custos de produção, pode favorecer a síntese de novos homólogos com funções específicas.

O objetivo deste capítulo é avaliar os mutantes selecionados no Capítulo 1 frente à 4 fontes de carbono, visando a seleção de um único mutante, com alta produção de ramnolipídios, para realização das fermentações em biorreator.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Micro-organismos

Na Tabela 4.1 podem-se verificar os mutantes avaliados nesta etapa e as respectivas fontes de carbono utilizadas (B.O.A – borra de óleo de algodão; B.O.M – borra de óleo de milho; B.O.S – borra de óleo de soja e O.M – óleo de mamona). Os resíduos do processamento de óleos vegetais foram fornecidos pela Cargill S.A (Brasil) e o óleo de mamona pela Bom Brasil Ltda (Salvador – BA).

**Tabela 4.1** - Lista de mutantes e fontes de carbono avaliados

| MUTANTE                              | B.O.A | B.O.M | B.O.S | OM |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|----|
| <i>P. aeruginosa</i> LBI             | X     | X     | X     | X  |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1B10</b> | X     | X     |       | X  |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1C10</b> | X     |       |       |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1E3</b>  | X     |       |       |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1F8</b>  | X     |       |       |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2A1</b>  |       | X     |       | X  |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2B4</b>  |       | X     |       |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2B10</b> |       | X     |       | X  |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2G2</b>  |       |       | X     |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2H5</b>  |       | X     |       |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>3C10</b> |       |       | X     |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>4B7</b>  |       |       | X     |    |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>4E3</b>  |       | X     |       | X  |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>4E11</b> |       | X     | X     |    |

## 4.2.2 Meios de cultura

### 4.2.2.1 Sais de Robert (SR)

Para a produção de biossurfactante em frascos de Erlenmeyer foi utilizado como base o meio de cultivo salino descrito por Robert et al. (1989). As fontes de carbono avaliadas foram óleo de mamona, borra de óleo de algodão, milho e soja, adicionados na concentração de 2% (p/v) (inóculo e fermentação), 12,5% (p/v) (inóculo) ou 25% (p/v) (fermentação). Para a avaliação da água de maceração de milho (AMM) como possível fonte de nitrogênio, foi utilizado o mesmo meio descrito acima, porém com diferentes proporções de NaNO<sub>3</sub> e AMM (Tabela 4.2). Para os cálculos considerou-se que a água de maceração de milho e o NaNO<sub>3</sub> contêm 6% (p/p) e 16% (p/v) de nitrogênio, respectivamente. O pH inicial do meio foi ajustado, com HCl 2 mol/L/ NaOH 2 mol/L, para 6,8. Todo material utilizado nos ensaios fermentativos foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

**Tabela 4.2** – Proporção de NaNO<sub>3</sub> e água de maceração de milho no meio de cultivo para produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI e seus mutantes

| Meio de Cultivo | NaNO <sub>3</sub> (%) | AMM (%)           |
|-----------------|-----------------------|-------------------|
| 1               | 100 (4g/L)            | 0                 |
| 2               | 50 (2g/L)             | 50 (5,5 mL/L v/v) |
| 3               | 0                     | 100 (11 mL/L v/v) |

### 4.2.2.2 Caldo Nutriente e Luria Bertani

A composição dos meios utilizados para o pré-cultivo dos micro-organismos em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona - 10; extrato de levedura - 5,0 e NaCl - 10 (LB).

## 4.3.3 Condições de cultivo

Os experimentos conduzidos no Brasil (UNESP - Laboratório de Microbiologia Industrial - LMI) foram identificados pela letra A e aqueles desenvolvidos na Alemanha (Universidade de Karlsruhe) por B.

### **4.3.3.1 Preparo do Inóculo**

#### **4.3.3.1.1 Inóculo A**

O inóculo A foi feito a partir dos tubos de cultura estoque, onde 2% (v/v) de cada mutante foi adicionado a frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de caldo nutriente, em seguida os mesmos foram incubados durante 24 horas a 30 °C e 200 rpm. Após este período foram realizadas leituras de absorvância a  $\lambda = 600$  nm (Espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC) e diluições, com solução salina 0,85% (p/v) estéril, para padronização da Densidade Óptica (D.O.) $_{600} = 0,70 \pm 0,02$ . Após atingir a densidade desejada, 4% (v/v) desta solução foi transferida para Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL caldo nutriente, os frascos permaneceram sob agitação por 24 horas, à 200 rpm e 30°C.

#### **4.3.3.1.2 Inóculo B**

Primeiramente os micro-organismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio LB e 100  $\mu$ L da cultura estoque da linhagem a ser avaliada, a incubação foi feita em mesa agitadora durante 24 horas à 30 °C e 120 rpm. Em seguida transferiu-se 2,5 mL do pré-cultivo para frascos de 500 mL com 100 mL de Sais de Robert e 2 ou 12,5% (p/v) de borra de óleo de milho ou óleo de mamona, incubou-se por 24 horas à 30°C e 130 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação do meio de produção, resultando em uma D.O $_{580nm}$  inicial da fermentação de 0,06. Todos os frascos utilizados foram do tipo aletado e para evitar que o tampão ficasse úmido, diminuiu-se a velocidade de agitação.

### **4.3.3.2 Experimentos em Erlenmeyer**

#### **4.3.3.2.1 Experimento A**

Este protocolo foi utilizado na avaliação de borra de algodão, soja ou milho e NaNO<sub>3</sub>/ água de maceração de milho como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Estes experimentos foram feitos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL de meio mineral (SR) e o inóculo adicionado na concentração de 4% (v/v). Os frascos foram incubados por 72 horas, à 200 rpm e 30 °C. As amostras foram retiradas a

cada 24 horas para análise do crescimento e produção de ramnolipídios. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

#### **4.3.3.2.2 Experimento B**

A avaliação das fontes de carbono (borra de óleo de milho e óleo de mamona) e nitrogênio (NaNO<sub>3</sub> e água de maceração de milho) foi feita em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 50 mL de meio mineral (SR) e o inóculo adicionado de acordo com o que foi descrito (item 4.3.3.1.2 Inóculo B). Os frascos foram incubados por 72 horas, à 130 rpm e 30°C. As amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise do crescimento, produção de ramnolipídios e consumo da fonte de carbono. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

O mutante selecionado e a linhagem selvagem foram avaliados nas mesmas condições descritas neste item, porém com uma concentração de fonte de carbono maior (250 g/L de borra de óleo de milho ou óleo de mamona).

#### **4.3.4 Métodos Analíticos**

##### **4.3.4.1 Processamento das amostras**

O processamento das amostras proveniente do experimento A seguiu-se da seguinte maneira: 20 mL do caldo fermentado foi centrifugado à 10.000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de ramnose e o pellet para quantificação da biomassa, ambos descritos abaixo.

O volume de amostra retirado, nos experimentos B, foi 5mL. Prosseguiu-se misturando n-hexano às amostras (1:1) e agitando vigorosamente por 1 minuto, a mistura foi centrifugada à 4000 rpm, 4°C e 30 min para que houvesse separação das 3 fases: células / fase aquosa / n-hexano.

##### **4.3.4.2 Avaliação da produção de Ramnolipídios**

Uma alíquota da fase aquosa foi utilizada para quantificação de ramnolipídios. Primeiramente adicionou-se H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% 1:100 (v/v) para ajustar o pH para 2 ou 3, levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Em seguida utilizou-se acetato de etila

1:1,25 (v/v) para extração do tensoativo; centrifugou-se à 10.000 rpm, 4°C e 10 min, retirou-se a fase superior e repetiu-se o procedimento com acetato de etila.

#### **4.3.4.2.1 Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada (B)**

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar se houve produção de ramnolipídios antes de prosseguir às análises em HPLC. Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte mistura: clorofórmio / metanol / ácido acético (65:15:2). O agente revelador utilizado foi a seguinte mistura 2 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico. As amostras consistiram em 10 µL de extratos de ramnolipídios obtidos, a partir do caldo livre de células, em diferentes tempos de fermentação, além dos padrões de ramnolipídios obtidos pela Jeneil Biosurfactant Company, USA.

#### **4.3.4.2.2 Determinação da concentração de Ramnose– Ácido Sulfúrico (A)**

A concentração de ramnose foi determinada pelo método descrito por CHANDRASEKARAN e BEMILLER (1980). Já descrito no Cap.1.

#### **4.3.4.2.3 Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC (B)**

##### **1. Derivatização**

Para que os ramnolipídios fossem analisados via detector UV, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com o que foi descrito por Schenk et al., (1995), com pequenas modificações. As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360 µL de acetonitrila e 40 µL da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40mM e Trietilamina 20mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um banho seco (*Thermomixer* comfort, Eppendorf AG).

##### **2. HPLC**

As análises foram feitas com um equipamento HPLC (Shimatzu) acoplado a um detector UV. Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio nas seguintes concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g/L. Para as análises

utilizou-se uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC18, Supelco - 150 mm x 4.6 mm, 5 µm sílica gel) à 30°C. As fases móvel foram Solução A com 5% de metanol e Solução B com 95%, ambas em água ultra pura. Para que houvesse separação dos homólogos presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 à 100% da Solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da sol. B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida ocorreu um decréscimo para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm. Os tempos de retenção foram  $21,5 \pm 0,1$  min pra Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>  $22,2 \pm 0,1$  min para Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>.

#### **4.3.4.3 Determinação da biomassa microbiana**

##### **4.3.4.3.1 Determinação A – Laboratório de Microbiologia Industrial**

Para a determinação da biomassa microbiana o pellet resultante da centrifugação foi lavado por duas vezes em igual volume de solução salina 0,85%. Após esse processo as células foram ressuspensas em 1 ou 2 mL de salina e colocadas para secar em formas de alumínio previamente pesadas, estas foram mantidas em estufa de secagem por 24 horas à 60°C. Após este período eram mantidas em dessecador até atingir a temperatura ambiente e então pesadas novamente.

##### **4.3.4.3.2 Determinação B - Universidade de Karlsruhe**

Após a separação das 3 fases (item 5.3.4.1) o pellet de células foi ressuspenso em NaCl 0,85% (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 4600g, 4°C e 30 min. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantidos em estufa à 100°C até atingir peso constante.

##### **4.3.4.4 Determinação do óleo residual**

A fase de n-hexano foi usada para determinação gravimétrica das concentrações de óleo, depois da evaporação do solvente.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos com as fermentações conduzidas em frascos, avaliando diferentes fontes de carbono e nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$  e água de maceração de milho). Estes experimentos foram divididos em duas etapas, primeiro aqueles desenvolvidos no Brasil (**Etapa A**), onde se avaliou borra de óleo de algodão, soja e de milho como fontes de carbono, bem como as fontes de nitrogênio citadas. A segunda fase (**Etapa B**) foi executada na Alemanha, quando foram testadas as seguintes fontes de carbono: óleo de mamona e a borra de óleo de milho.

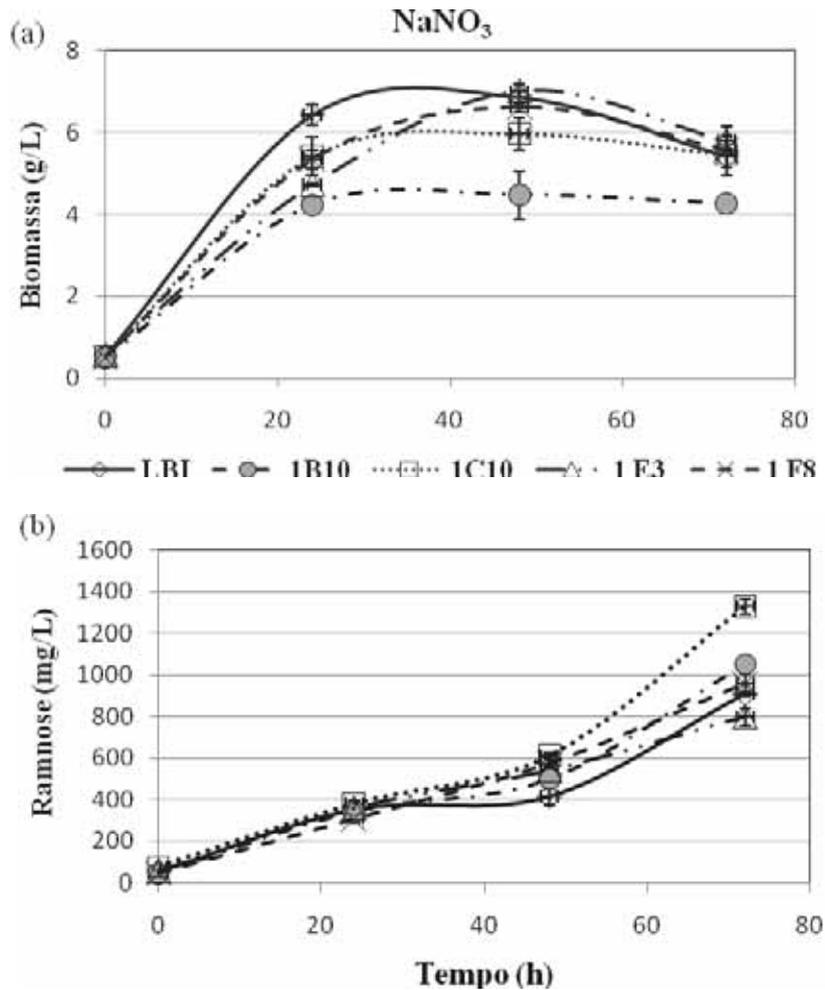
### 4.3.1 Experimentos em Erlenmeyer - Etapa A

#### 4.3.1.1 Borra de Óleo de Algodão

Foram avaliadas a linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e quatro mutantes, sendo eles: *P. aeruginosa* LBI **1B10**, *P. aeruginosa* LBI **1C10**, *P. aeruginosa* LBI **1E3** e *P. aeruginosa* LBI **1F8**.

##### 4.3.1.1.1 Crescimento e produção de ramnolipídios em meio contendo $\text{NaNO}_3$

O crescimento máximo dos micro-organismos avaliados ocorreu em 48 horas de fermentação. A biomassa obtida variou entre 6,0 e 7,0 g/L, com exceção do mutante *P. aeruginosa* LBI **1B10**, que ficou abaixo dos demais, atingindo  $4,5 \pm 0,5$  g/L de células (Fig. 4.1a). Após 48 horas houve um pequeno declínio na biomassa, mas não foi observada influência negativa na síntese de ramnolipídios, o que é comprovado pelo aumento na produção após o período citado acima (Fig. 4.1b).



**Figura 4.1** - (a) Crescimento celular (g/L) e (b) produção de ramnose (mg/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes (*P. aeruginosa* LBI 1B10, 1C10, 1E3 e 1F8), utilizando borra de óleo de algodão como fonte de carbono e  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio.

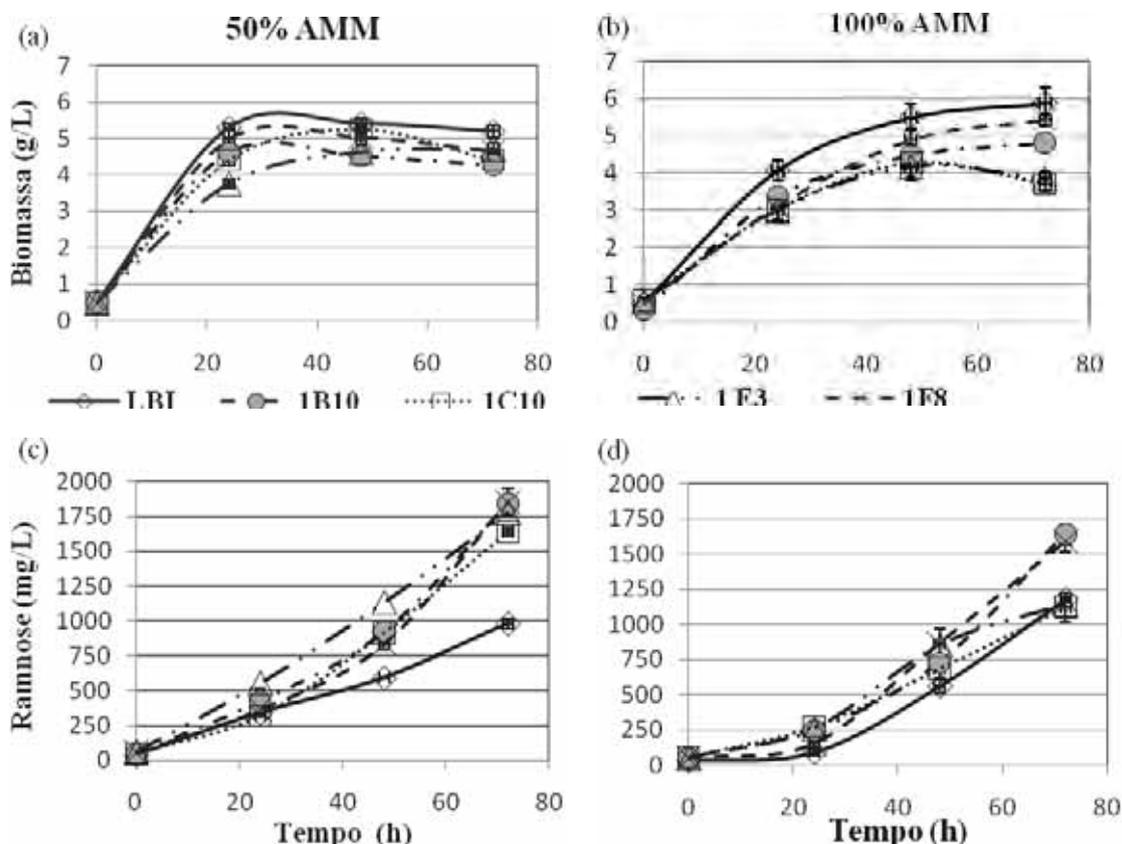
A produção do biossurfactante ocorreu em duas etapas, do início da fermentação até 24 horas, em seguida houve desaceleração da síntese, e como já citado, o período de maior produção foi após 48 horas de fermentação. A concentração máxima de ramnose alcançada pela bactéria selvagem foi de  $910,27 \pm 12,20$  mg/L, já o mutante *P. aeruginosa* LBI 1C10, produziu  $1329,70 \pm 37,10$  mg/L, o aumento, em relação à *P. aeruginosa* LBI, foi de 46%.

A produção do mutante *P. aeruginosa* LBI 1F8 ficou aquém do esperado, pois de acordo com a seleção primária, este seria o clone com maior destaque, já que apresentou uma produção de ramnolipídios 92% superior à da linhagem sem modificação genética. A concentração mais alta de ramnose atingida por esse microrganismo nos experimentos em frasco foi de  $959,50 \pm 49,90$  mg/L, com um aumento de apenas 5%.

#### 4.3.1.1.2 Crescimento e produção de ramnolipídios em meio contendo AMM

Ao utilizar 50%  $\text{NaNO}_3$  + 50% AMM, houve estabilização do crescimento dos micro-organismos após 24 horas, já com o uso de 100% de AMM o crescimento mantém-se até o final do experimento, exceto para os mutantes *P. aeruginosa* LBI 1C10 e 1E3, que apresentam uma suave queda na quantidade de células após 48 horas (Fig. 4.2 a, b)

O crescimento foi superior quando se utilizou  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio, porém como nessa condição ocorre um pequeno declínio na quantidade de células após 48 horas, as biomassas correspondentes a cada condição, ficam muito próximas no final da fermentação. Os maiores valores de biomassa, nas duas condições avaliadas, foram alcançados pela bactéria selvagem que atingiu 5,4 e 5,9 g/L, nos meios com 50%  $\text{NaNO}_3$  + 50% AMM e 100% AMM, respectivamente.



**Figura 4.2 - (a, b)** Crescimento celular (g/L) e **(c, d)** produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes (*P. aeruginosa* LBI 1B10, 1C10, 1E3 e 1F8), utilizando borra de óleo de algodão como fonte de carbono e 50%  $\text{NaNO}_3$  + 50% AMM **(a, c)** e 100% AMM **(b, d)** como fonte de nitrogênio.

A produção de ramnose da linhagem selvagem e dos mutantes selecionados, nas duas condições onde se utilizou água de maceração de milho, foi superior à alcançada em nitrato

de sódio, exceto para *P. aeruginosa* LBI **1C10** com 100% de AMM como fonte de nitrogênio.

Nos experimentos onde se utilizou 50% NaNO<sub>3</sub> + 50% AMM para o cultivo de *P. aeruginosa* LBI, a concentração máxima de ramnose foi de 991,9 mg/L; os mutantes com maior destaque na produção e os respectivos aumento em relação à linhagem selvagem foram *P. aeruginosa* LBI **1F8** - 87%; **1B10** - 86% e **1E3** - 79% (Fig. 4.2 c). A curva de produção nesta condição manteve-se crescente durante as 72 horas de fermentação, não sendo observada síntese de ramnose em duas etapas.

Com o emprego de 100% de AMM a bactéria controle produziu 1175,1 mg/L de ramnose, e os mutantes **1B10** e **1F8**, quando comparados à *P. aeruginosa* LBI, apresentaram incrementos na síntese de 40 e 35%, respectivamente (Fig. 4.2 d). Observa-se que o perfil de produção de ramnose é diferente das demais condições estudadas; até 24 horas de fermentação a concentração de produto formada é menor, em seguida a síntese intensifica-se, coincidindo com a desaceleração do crescimento dos micro-organismos.

A seguir são descritos as relações produto/ biomassa, calculados para os mutantes e a linhagem selvagem crescidos em borra de óleo de algodão e nas diferentes fontes de nitrogênio propostas (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** - Relações produto/ biomassa ( $Y_{p/x}$ ), da produção de ramnolipídios por mutantes e linhagem selvagem cultivados em diferentes fontes de nitrogênio e borra de óleo de algodão como fonte de carbono

| Fontes de Nitrogênio            | Relação ( $Y_{p/x}$ – g/g) |       |       |       |       |
|---------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                 | LBI                        | 1B10  | 1C10  | 1E3   | 1F8   |
| NaNO <sub>3</sub>               | 0,134                      | 0,251 | 0,237 | 0,115 | 0,149 |
| 50% AMM + 50% NaNO <sub>3</sub> | 0,194                      | 0,438 | 0,334 | 0,408 | 0,396 |
| 100% AMM                        | 0,211                      | 0,354 | 0,286 | 0,282 | 0,313 |

Analisando-se os valores das relações produto/ biomassa, fica evidente que a melhor linhagem é *Pseudomonas aeruginosa* LBI **1B10**, pois nas três condições avaliadas este mutante foi mais eficiente, quando comparado à bactéria selvagem e aos demais mutantes.

O uso da mistura de uma fonte orgânica e outra inorgânica como fonte de nitrogênio, foi a condição onde ocorreu a maior síntese de produto por grama de célula.

Somente a linhagem selvagem apresentou maior fator de conversão produto/ biomassa com o uso de 100% de AMM.

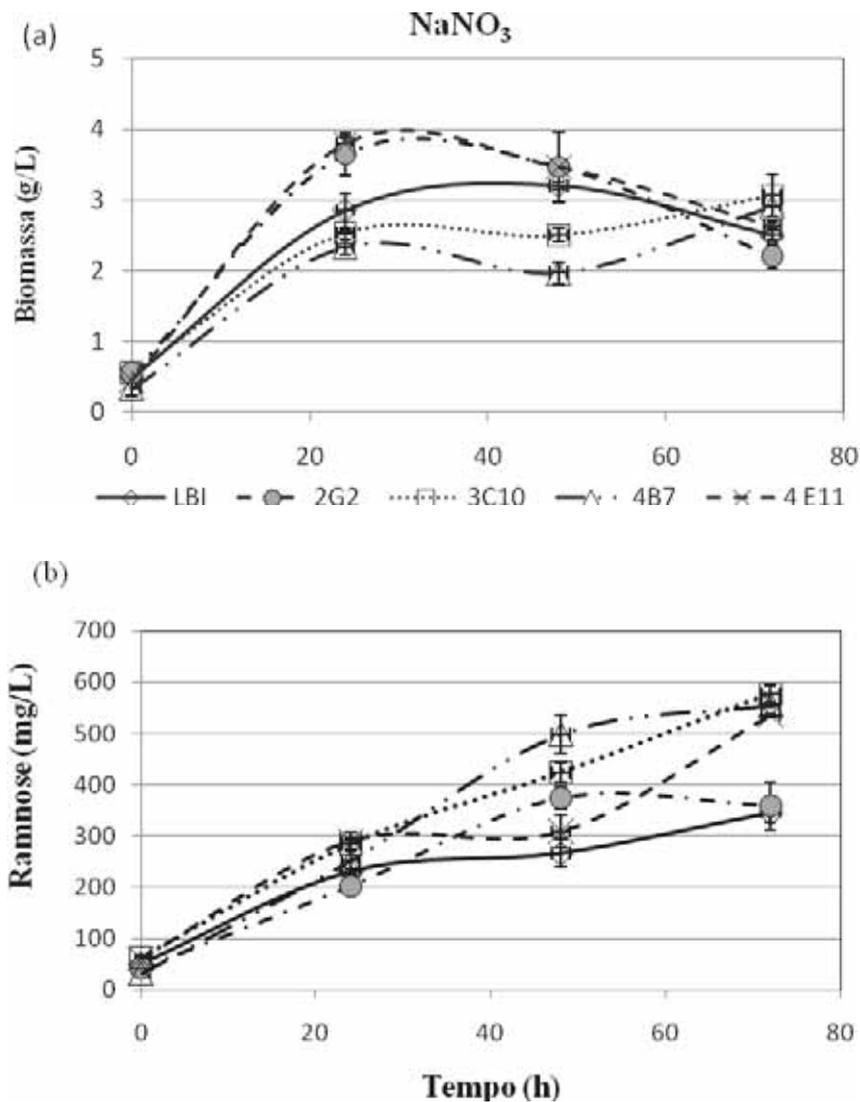
#### **4.3.1.2 Borra de Óleo de Soja**

Foram avaliadas a linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e quatro mutantes, sendo eles: *P. aeruginosa* LBI **2G2**, *P. aeruginosa* LBI **3C10**, *P. aeruginosa* LBI **4B7** e *P. aeruginosa* LBI **4E11**.

##### **4.3.1.2.1 Crescimento e produção de ramnolipídios em meio contendo NaNO<sub>3</sub>**

A biomassa da bactéria controle, *P. aeruginosa* LBI, nas fermentações com borra de óleo de soja,  $3,20 \pm 0,05$  g/L, foi 54% menor do que a obtida com a borra de algodão. Os perfis de crescimento da bactéria selvagem e dos mutantes **2G2** e **4E11** foram semelhantes, após atingir o pico de crescimento, não se observa estabilização e sim declínio da biomassa; já com *P. aeruginosa* LBI **3C10** e **4B7** houve multiplicação celular até o final da fermentação. Apesar das diferenças nas curvas de crescimento, a variação da quantidade de células entre as linhagens avaliadas foi pequena, após 72 horas a biomassa dos micro-organismos variou de 2,2 a 3,0 g/L (Fig. 4.3 a).

Assim como observado para o crescimento da linhagem selvagem, a produção de ramnose foi menor em borra de óleo de soja, a concentração máxima foi de 345,2 mg/L em 72 horas de fermentação, que é cerca de 60% inferior à obtida com borra de algodão e nitrato de sódio.



**Figura 4.3 - (a)** Crescimento celular (g/L) e **(b)** produção de ramnose (mg/L) da linhagem selvagem quatro mutantes (*P. aeruginosa* LBI 2G2, 3C10, 4B7 e 4E11), utilizando borra de óleo de soja como fonte de carbono e NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio.

Os resultados obtidos com o mutante *P. aeruginosa* LBI **2G2**, não confirmam o seu potencial em produzir concentrações mais altas de ramnolipídios do que *P. aeruginosa* LBI, como foi observado na seleção inicial. Salienta-se que, em 48 horas de fermentação, o mutante **2G2** alcançou uma concentração de produto 28% superior à da linhagem selvagem, podendo-se considerar *P. aeruginosa* LBI **2G2** como melhor opção para a produção, quando comparada à bactéria parental, já que os custos com a produção seriam reduzidos devido ao menor tempo de fermentação. A produção cessou, provavelmente, devido à queda na população microbiana. Uma alternativa seria a adição de nutrientes de

maneira intermitente para evitar a morte celular, com isso a síntese do produto não cessaria.

As concentrações de ramnose alcançadas pelos demais mutantes foram muito próximas após 72 horas de fermentação, porém os perfis de produção diferiram. A produção de ramnose dos mutantes **3C10**, **4B7** e **4E11** foram  $577,30 \pm 17,20$ ;  $555,80 \pm 4,70$  e  $535,20 \pm 4,70$ , respectivamente (Fig. 4.3 b).

A bactéria não modificada e o mutante **4E11** produziram o biossurfactante em duas etapas. Houve síntese de ramnose no período de 0 – 24 horas, em seguida observa-se uma desaceleração e após 48 horas a produção volta a ocorrer, porém de maneira mais acentuada no mutante, cuja concentração de ramnose foi 52% maior do que a obtida pelo micro-organismo selvagem.

Os mutantes **2G2** e **4B7** mantiveram uma produção acentuada até 48 horas, em seguida verifica-se uma tendência à estabilização da síntese, diferente do mutante **3C10** cuja curva foi ascendente até 72 horas de fermentação, sem apresentar períodos de desaceleração. Quando comparado ao micro-organismo selvagem o aumento na produção dos mutantes de destaque, **3C10** e **4B7**, foi de 67 e 61%, respectivamente.

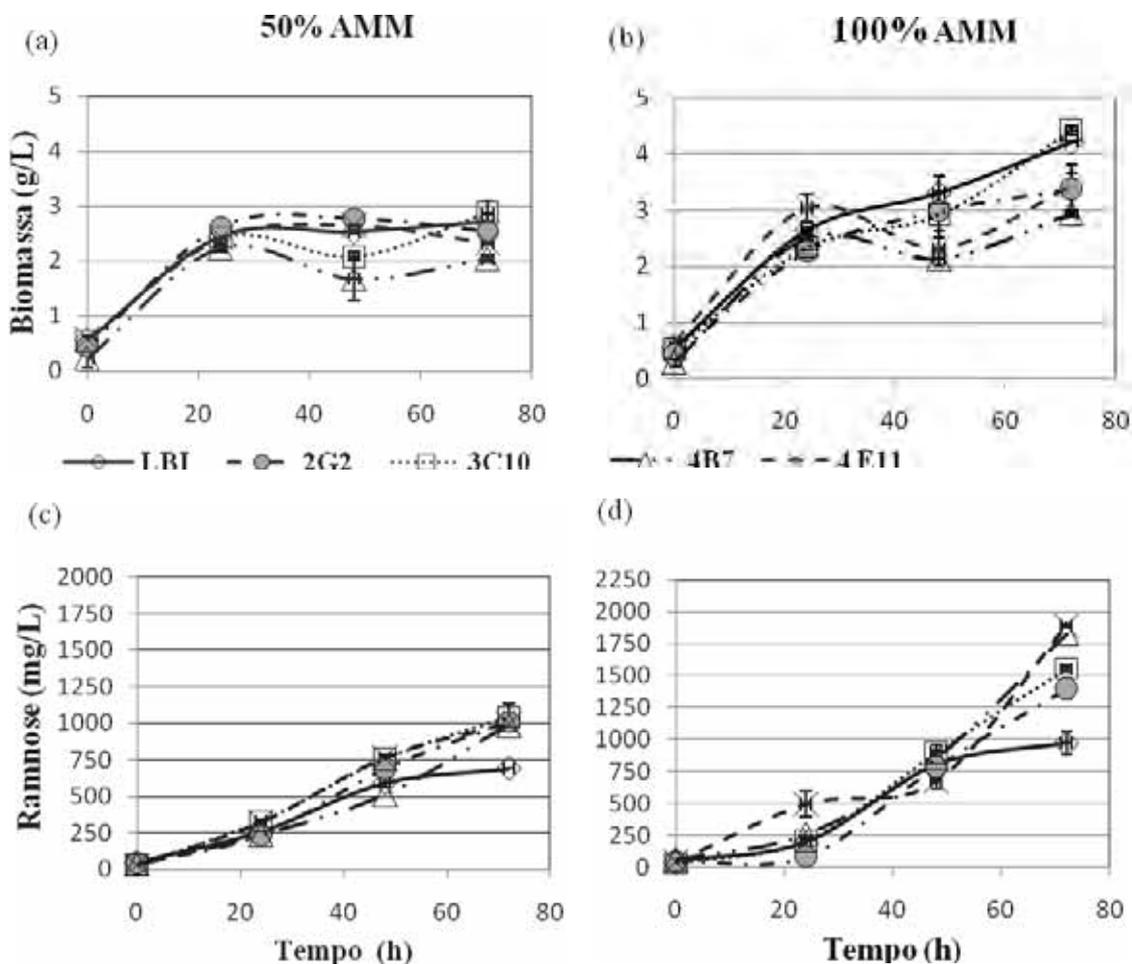
#### **4.3.1.2.2 Crescimento e produção de rannolipídios em meio contendo AMM**

O crescimento da linhagem selvagem nas duas condições avaliadas ocorreu até 72 horas e atingiu  $2,70 \pm 0,10$  g/L no meio onde se usou  $\text{NaNO}_3$ / AMM e  $4,20 \pm 0,01$  g/L com 100% de AMM. O emprego dessa fonte alternativa, como única fonte de nitrogênio, favoreceu o crescimento da bactéria (Fig. 4.4 a,b).

Ao utilizar a mistura de nitrato de sódio e água de maceração de milho o crescimento máximo entre os mutantes avaliados variou de 2,2 a 2,9 g/L. Após 48 horas de fermentação houve um pequeno declínio no crescimento dos mutantes **2G2** e **4E11** e no final do experimento a quantidade de células era  $2,50 \pm 0,15$  e  $2,30 \pm 0,02$  g/L, respectivamente. Os mutantes **3C10** e **4B7** exibiram declínio no crescimento entre 24 e 48 horas de fermentação, porém voltaram a crescer após este período (Fig. 4.4 a).

Nas fermentações em que se utilizou 100% AMM, o crescimento dos micro-organismos ocorreu até 72 horas. Em todos os casos, a biomassa aumenta de modo acentuado até 24 horas, passa por um período de desaceleração até 48 horas e volta a ocorrer depois deste período (Fig. 4.4 b). Nesta condição o crescimento das linhagens avaliadas foi superior ou muito próximo ao alcançado com nitrato de sódio. A biomassa

referente aos diferentes mutantes em g/L foi de  $3,40 \pm 0,45$  g/L para *P. aeruginosa* LBI **2G2**;  $4,40 \pm 0,07$  g/L para *P. aeruginosa* LBI **3C10**;  $2,90 \pm 0,10$  g/L para *P. aeruginosa* LBI **4B7** e  $3,40 \pm 0,20$  g/L para *P. aeruginosa* LBI **4E11**.



**Figura 4.4** - (a, b) Crescimento celular (g/L) e (c, d) produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes (*P. aeruginosa* LBI **2G2**, **3C10**, **4B7** e **4E11**), utilizando borra de óleo de soja como fonte de carbono e 50%  $\text{NaNO}_3$  + 50% AMM (a, c) e 100% AMM (b, d) como fonte de nitrogênio.

O uso da mistura de nitrato e AMM, favoreceu a produção de ramnose, pois, quando comparamos com os resultados obtidos com  $\text{NaNO}_3$ , verifica-se que houve aumentos significativos na concentração do biossurfactante, inclusive para a linhagem selvagem. A bactéria *P. aeruginosa* LBI, produziu  $693,10 \pm 2,20$  mg/L de ramnose, enquanto a produção dos mutantes **2G2**, **3C10**, **4B7** e **4E11** foi de  $1004,50 \pm 8,20$ ;  $1040,00 \pm 88,10$ ;  $983,00 \pm 14,40$  e  $994,60 \pm 14,90$  g/L, respectivamente; a partir dos valores citados

verifica-se que as concentrações alcançadas pelos micro-organismos modificados foram muito próximas entre si (Fig. 4.4 c).

O perfil de produção de ramnose, com 100% de AMM, assemelha-se ao descrito com borra de óleo de algodão, onde a produção de ramnose foi mais lenta nas primeiras 24 horas de experimento e acelerou a partir desse período, com exceção do mutante **4E11**, que diminuiu a intensidade de síntese, acelerando somente após 48 horas. O produto foi em grande parte sintetizado após a fase exponencial de crescimento dos micro-organismos. A diferenciação na concentração de ramnose alcançada pela linhagem selvagem e os mutantes ocorreu após 48 horas, neste período *P. aeruginosa* LBI estabilizou a produção, diferente dos micro-organismos modificados que manteve a síntese do biossurfactante (Fig. 4.4 d).

A produção de ramnose de *P. aeruginosa* LBI foi  $972,90 \pm 81,80$ ; a concentração de ramnose alcançada pelos mutantes e os respectivos aumentos na produção em relação à bactéria selvagem foi *P. aeruginosa* LBI **2G2** -  $1398,20 \pm 81,10$  (44%); **3C10** -  $1555,70 \pm 23,20$  (60%); **4B7** -  $1827,30 \pm 23,90$  (88%) e **4E11** -  $1892,60 \pm 6,70$  (94,5%). A água de maceração de milho como fonte de nitrogênio foi eficiente, pois foi constatado aumento no crescimento e produção de ramnose de todos os micro-organismos testados. Vale ressaltar que o aumento da produção em relação à linhagem selvagem foi superior, quando comparado às demais condições avaliadas ( $\text{NaNO}_3$  e a mistura 50%  $\text{NaNO}_3$  + 50% AMM).

Dentre os perfis de produção observados nas fermentações com borra de óleo de algodão e soja, verificou-se que para alguns mutantes a síntese de ramnolipídios ocorreu em duas etapas, ou seja, produção nas primeiras 24 horas, desaceleração entre 24 e 48 horas de fermentação e intensificação da produção após este período.

De acordo com Sotirova et al. (2009), os ramnolipídios aumentam a hidrofobicidade da célula, removendo os lipopolissacarídeos presentes na membrana externa das bactérias Gram negativas, sendo assim a primeira etapa de produção do ramnolipídio pode ter ocorrido para promover a solubilização da fonte de carbono e aumentar a hidrofobicidade da superfície celular, o que facilitaria o consumo do substrato hidrofóbico pelo micro-organismo. A segunda etapa da síntese caracteriza a produção de um metabólito secundário, que ocorre durante a fase estacionária de crescimento, que pode estar relacionada à limitação de nitrogênio. A depleção deste nutriente impede o crescimento da população, que se mantém constante e na presença da fonte de carbono tem o metabolismo voltado para a produção de ramnolipídios. Há relatos de que a limitação de

nitrogênio causou aumento significativo na síntese de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* (SYLDATTK et al., 1985; CAMPOS-GARCIA et al., 1998).

Os ramnolipídios são considerados fatores de virulência e por isso a expressão dos genes responsáveis pela sua síntese está sob controle do sistema de “quorum sensing”. O quorum sensing é caracterizado pela produção de compostos difusíveis denominados autoindutores, os quais promovem a comunicação intercelular. Em baixas densidades celulares estes sinalizadores químicos são produzidos em níveis basais, porém quando a biomassa aumenta, estes compostos se acumulam no ambiente extracelular e no interior das células. Em concentrações elevadas, forma-se o complexo autoindutor/ proteína regulatória, que no caso da síntese de ramnolipídios seria N-butanol-L-homoserina lactona/ RhlR, que age na ativação do operon rhlABRI, responsável pela formação das moléculas de ramnolipídios (WAGNER et al., 2008). Tal mecanismo de regulação explica porque a produção desses compostos ocorre de maneira mais acentuada, durante a fase estacionária de crescimento, onde já se atingiu máxima densidade celular.

A seguir são descritos as relações produto/ biomassa, calculados para os mutantes crescidos em borra de óleo de soja e nas diferentes fontes de nitrogênio propostas (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4** - Relações produto/ biomassa ( $Y_p/x$ ), da produção de ramnolipídios por mutantes e linhagem selvagem cultivados em diferentes fontes de nitrogênio e borra de óleo de soja como fonte de carbono

| Fontes de Nitrogênio            | Relações ( $Y_p/x$ – g/g) |       |              |              |              |
|---------------------------------|---------------------------|-------|--------------|--------------|--------------|
|                                 | LBI                       | 2G2   | 3C10         | 4B7          | 4E11         |
| NaNO <sub>3</sub>               | 0,127                     | 0,120 | <b>0,226</b> | 0,213        | 0,160        |
| 50% AMM + 50% NaNO <sub>3</sub> | 0,324                     | 0,424 | 0,442        | <b>0,499</b> | <b>0,498</b> |
| 100% AMM                        | 0,267                     | 0,469 | 0,402        | <b>0,695</b> | <b>0,7</b>   |

Os maiores valores de relação produto/biomassa foram obtidos pelos mutantes **3C10**, **4B7** e **4E11**, sendo que o primeiro se destacou no meio com nitrato de sódio e os dois últimos nos experimentos com adição de AMM. Dentre os quatro mutantes avaliados, três apresentaram melhor eficiência de conversão no meio com 100% AMM, nesta condição a conversão dos mutantes **4B7** e **4E11** foi 2,6 vezes maior que a da linhagem selvagem.

#### 4.3.1.3 Borra de Óleo de Milho

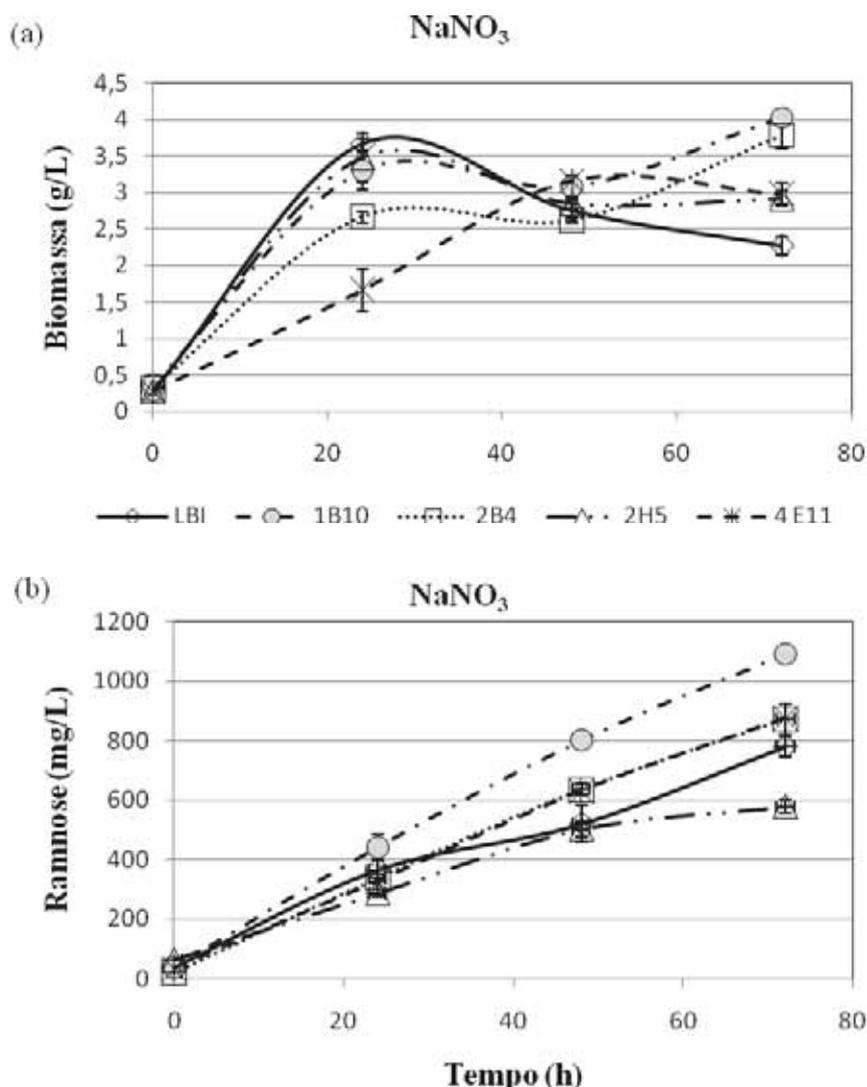
Foram avaliadas a linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e quatro mutantes, sendo eles: *P. aeruginosa* LBI **1B10**, *P. aeruginosa* LBI **2B4**, *P. aeruginosa* LBI **2H5** e *P. aeruginosa* LBI **4E11**.

##### 4.3.1.3.1 Crescimento e produção de rhamnolipídios em meio contendo NaNO<sub>3</sub>

A bactéria selvagem atingiu seu crescimento máximo ( $3,70 \pm 0,07$  g/L) em 24 horas, em seguida houve queda na massa celular que permaneceu em  $2,30 \pm 0,12$  g/L no final da fermentação. A linhagem **2H5** comportou-se de maneira semelhante à selvagem e sua biomassa final foi de  $2,90 \pm 0,10$  g/L. O perfil de crescimento dos mutantes **1B10** e **2B4** foi semelhante e ocorreu em duas etapas, atingindo  $4,00 \pm 0,06$  e  $3,80 \pm 0,19$  g/L de células, respectivamente. O mutante **4E11** atingiu o pico de crescimento em 48 horas com  $3,10 \pm 0,06$  g/L de células (Fig. 4.5 a).

A concentração de ramnose obtida pela bactéria não modificada ( $781,60 \pm 36,10$  mg/L) foi superior à da linhagem **2H5** ( $578,40 \pm 21,60$  mg/L) e próxima à dos mutantes **2B4** ( $873,50 \pm 51,90$  mg/L) e **4E11** ( $876,90 \pm 13,04$  mg/L). *P. aeruginosa* LBI **1B10** foi o mutante com maior aumento na síntese em relação à selvagem, 39%, alcançando uma concentração de  $1090,50 \pm 2,50$  mg/L de ramnose (Fig. 4.5 b).

A linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e o mutante **4E11** foram cultivados em borra de soja e de milho e a partir da comparação dos resultados obtidos nessas fontes de carbono, verifica-se que na segunda a produção de ramnose foi 126% maior para *P. aeruginosa* LBI e 66% para o mutante **4E11**.



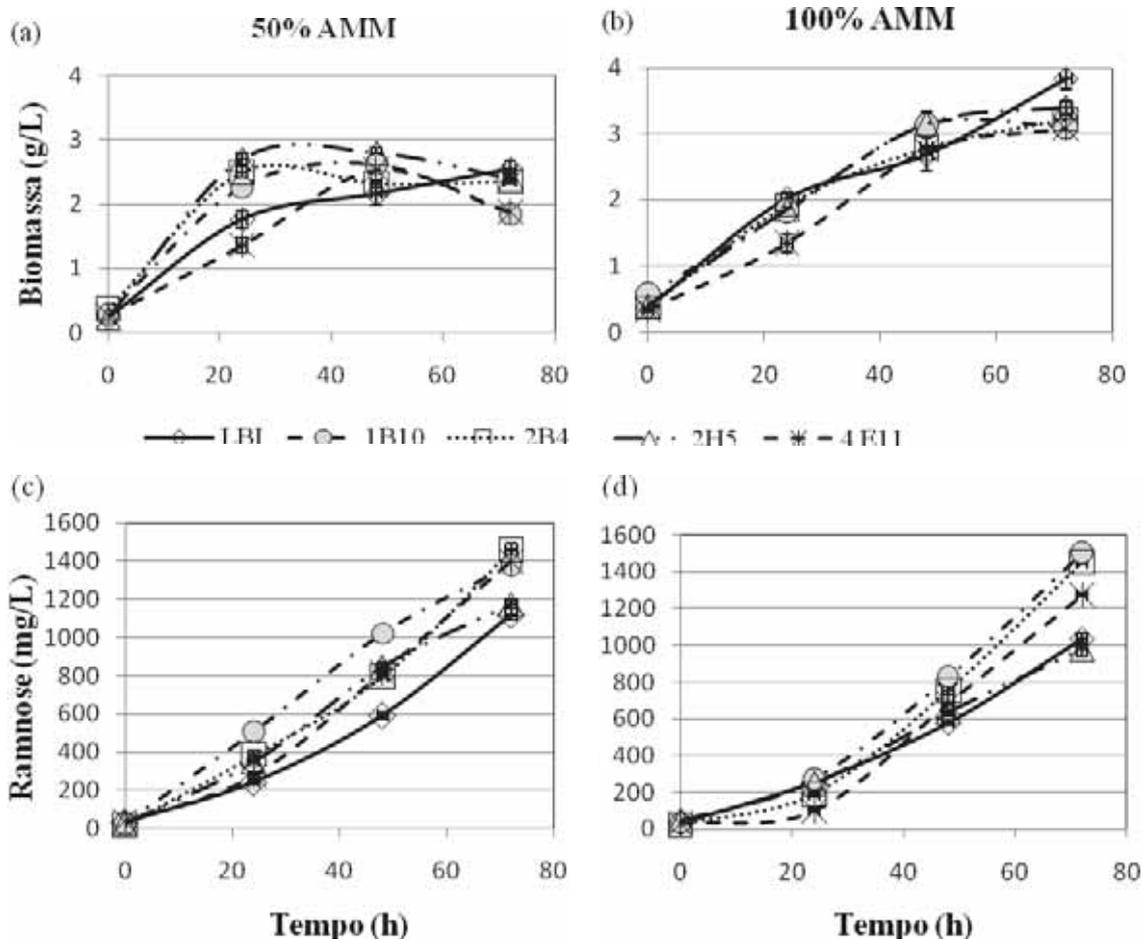
**Figura 4.5 - (a)** Crescimento celular (g/L) e **(b)** produção de rannose (mg/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes (*P. aeruginosa* LBI 1B10, 2B4, 2H5 e 4E11), utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono e NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio.

#### 4.3.1.3.2 Crescimento e produção de rannolipídios em meio contendo AMM

Foi observado um crescimento menor das linhagens quando se utilizou a mistura de fontes de nitrogênio (50% NaNO<sub>3</sub> + 50% AMM), o mesmo ocorreu com as linhagens crescidas em borra de óleo de soja. Os mutantes **1B10** e **4E11** atingiram crescimento máximo em 48 horas, em seguida entraram em declínio celular, estes apresentaram a menor biomassa no final da fermentação (1,9 g/L). A biomassa final da bactéria selvagem e dos mutantes **2B4** e **2H5** foram próximas, variando de 2,3 a 2,5 g/L (Fig 4.6 a).

Nas fermentações em que se usou 100% AMM, o crescimento da linhagem selvagem ocorreu em duas etapas atingindo  $3,80 \pm 0,16$  g/L de células. As demais bactérias avaliadas (**1B10**, **2B4**, **2H5** E **4E11**) apresentaram aumento de biomassa até o final da

fermentação, porém após 48 horas houve desaceleração do crescimento com tendência à estabilização (Fig. 4.6 b).



**Figura 4.6 - (a, b)** Crescimento celular (g/L) e **(c, d)** produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes (*P. aeruginosa* LBI **1B10**, **2B4**, **2H5** e **4E11**), utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono e 50% NaNO<sub>3</sub> + 50% AMM **(a, c)** e 100% AMM **(b, d)** como fonte de nitrogênio.

A adição de 50% de AMM como fonte de nitrogênio, favoreceu a produção de ramnose em todos os micro-organismos avaliados. Não foi observada diferença significativa entre a produção de ramnose da linhagem selvagem e do mutante **2H5**, cujas concentrações obtidas foram  $1118,9 \pm 30,9$  mg/L (*P. aeruginosa* LBI) e  $1174,20 \pm 24,80$  mg/L (*P. aeruginosa* LBI **2H5**), com um aumento de apenas 5%. A síntese de ramnose dos clones **1B10** ( $1381,10 \pm 0,70$  mg/L) , **2B4** ( $1457,80 \pm 37,30$  mg/L) e **4E11** ( $1401,10 \pm 61,60$  mg/L) foram próximas, o aumento em relação à bactéria controle ficou entre 17 e 24%. (Fig. 4.6 c).

O uso de 100% de AMM como fonte de nitrogênio favoreceu a manutenção celular por um período mais longo, diferente das outras condições, onde após 24 ou 48 horas iniciou-se a fase de declínio da biomassa. Por outro lado, esta condição não foi a melhor para a produção de ramnose pela bactéria selvagem, *P. aeruginosa* LBI e mutantes **2H5** e **4E11**, pois, quando comparado à condição em que se utilizou a mistura de NaNO<sub>3</sub> e AMM, houve um declínio na síntese de 8, 17 e 12%, respectivamente. Para o clone **2B4** a concentração de ramnose obtida, em ambas as condições, foram próximas, diferindo em apenas 0,5%. Já para *P. aeruginosa* LBI **1B10**, houve um aumento de 9% na concentração de ramnose nesta condição (Fig. 4.6 d).

A produção de ramnolipídios iniciou-se de maneira mais lenta nas fermentações onde se empregou borra de óleo (algodão, soja e milho) e AMM como fonte de nitrogênio; a maior parte do produto foi sintetizada após 24 horas, coincidindo com o período de desaceleração no crescimento dos micro-organismos. Há relatos de que a água de maceração de milho e resíduos oriundos do processamento de óleo contém carboidratos em sua composição (DOWD, 1996 e 1998; THE CORN REFINERS ASSOCIATION, 2006), dessa maneira, o consumo desses açúcares em associação com a borra de óleo, podem ter influenciado a velocidade de síntese de ramnolipídios. A fonte de carbono hidrofóbica sendo consumida em menor concentração no início da fermentação diminuiu a necessidade de biossurfactante para promover sua solubilização. Após a depleção dos açúcares, aumentou o consumo da borra e concomitantemente a produção do ramnolipídio.

A seguir são descritos as relações produto/ biomassa, calculados para os mutantes crescidos em borra de óleo de milho se nas diferentes fontes de nitrogênio propostas (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5** – As relações produto/ biomassa ( $Y_p/x$ ), da produção de ramnolipídios por mutantes e linhagem selvagem cultivados em diferentes fontes de nitrogênio e borra de óleo de milho como fonte de carbono

| Fontes de Nitrogênio            | Relação ( $Y_p/x - g/g$ ) |             |             |      |             |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|-------------|------|-------------|
|                                 | LBI                       | 1B10        | 2B4         | 2H5  | 4E11        |
| NaNO <sub>3</sub>               | 0,23                      | <b>0,30</b> | 0,25        | 0,18 | <b>0,29</b> |
| 50% AMM + 50% NaNO <sub>3</sub> | 0,48                      | 0,60        | <b>0,73</b> | 0,46 | 0,62        |
| 100% AMM                        | 0,30                      | <b>0,60</b> | 0,50        | 0,33 | 0,46        |

O mutante com a maior relação produto/ biomassa foi *P. aeruginosa* LBI **2B4**, em meio contendo a mistura de fontes de nitrogênio, porém *P. aeruginosa* LBI **1B10** se destacou em duas condições, com NaNO<sub>3</sub> e com 100% AMM, e ainda apresentou alto valor de conversão com a mistura de nitrato de sódio e AMM, por isso este mutante foi selecionado para a próxima etapa da pesquisa.

A linhagem de *P. aeruginosa* LBI e os mutantes avaliados foram capazes de consumir todas as fontes de carbono avaliadas, entretanto, os resultados evidenciam diferenças nos perfis de conversão produto/ biomassa obtidos com as diferentes fontes. Com borra de óleo de algodão o metabolismo bacteriano foi direcionado para o crescimento e devido à grande quantidade de células obtida, alcançou-se uma boa produção do biossurfactante, entretanto a eficiência de conversão produto/ biomassa foi a menor quando comparado com borra de soja e milho, sendo este último o resíduo que possibilitou as maiores taxas de conversão.

De acordo com Dowd (1998), o resíduo proveniente da produção de óleo de algodão contém menor porcentagem de componentes lipídicos do que a borra de óleo de milho. Os autores também relatam a existência de uma relação inversa entre a concentração de fósforo e ácidos graxos presentes na amostra. Tais características da borra de óleo de algodão podem ter influenciado o fluxo metabólico, pois havendo menor disponibilidade de fonte de carbono o metabolismo microbiano foi direcionado para o crescimento e não para a produção do biossurfactante. Além disso, uma maior concentração de fósforo presente no resíduo dificultou o estabelecimento de limitação desse nutriente no meio de cultivo, condição que favorece a produção de ramnolipídios. A produtividade específica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, cultivada em condições de limitação de fósforo, apresentou um aumento de quatro a cinco vezes, quando comparado aos resultados obtidos com limitação de nitrogênio (CHAYABUTRA et al., 2001).

Em relação a fonte de carbono, optou-se por continuar com a borra de óleo de milho, já que, as concentrações de ramnose alcançadas com esta fonte foram superiores às obtidas com borra de soja. A borra de algodão não foi mais empregada, por conter muitas impurezas e dificultar o processo fermentativo e a consequente purificação do produto.

#### **4.3.2 Experimentos em Erlenmeyer - Etapa B**

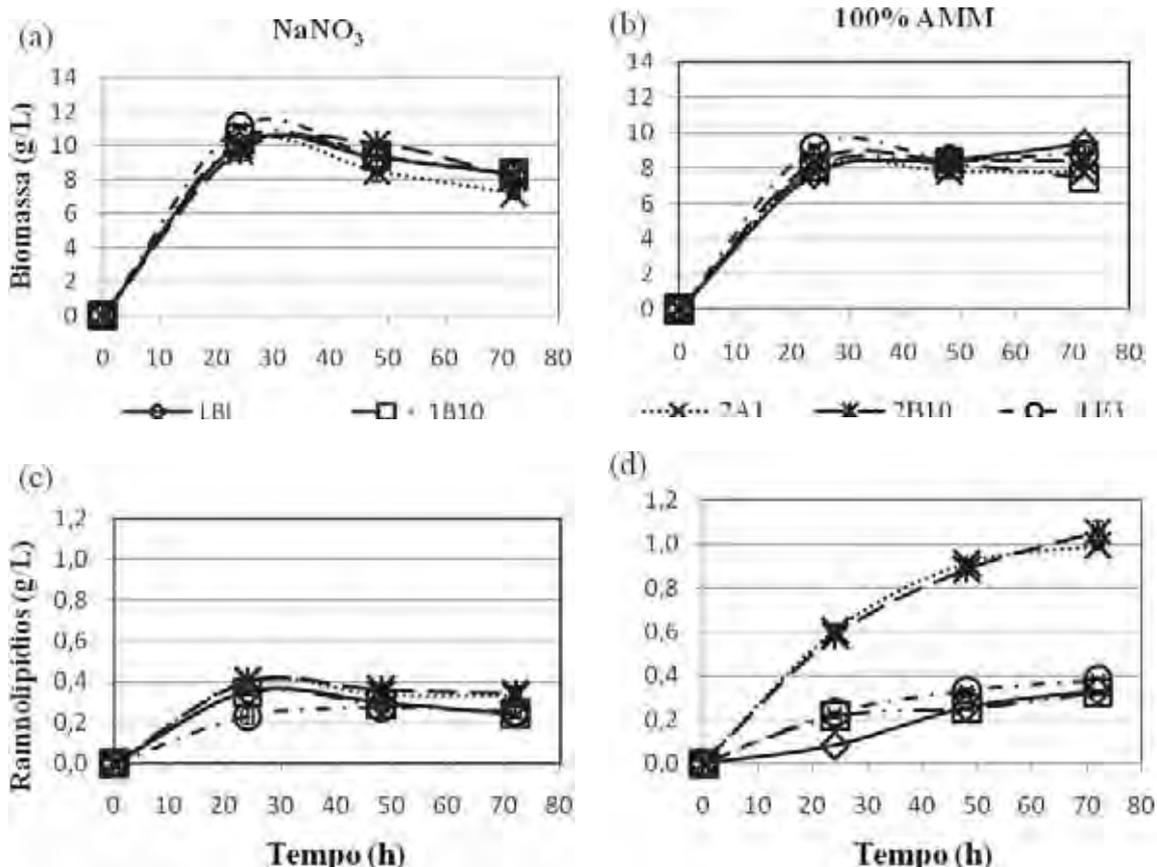
#### 4.3.2.1 Borra de Óleo de Milho

Os micro-organismos utilizados nesta etapa foram *P. aeruginosa* LBI **1B10**, selecionado a partir dos resultados obtidos na etapa anterior e àqueles escolhidos com base nos resultados do screening feito para óleo de mamona (Cap. 1): *P. aeruginosa* LBI **2A1**, *P. aeruginosa* LBI **2B10** e *P. aeruginosa* LBI **4E3**. Como controle utilizou-se a bactéria selvagem *P. aeruginosa* LBI.

Os resultados obtidos com a linhagem selvagem e os mutantes crescendo em meio contendo NaNO<sub>3</sub> e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, foram apresentados na Fig. 4.7.

Os perfis de crescimento de todos os micro-organismos avaliados foram muito semelhantes. A fase logarítmica de crescimento ocorreu nas primeiras 24 horas, a média da biomassa obtida pelos micro-organismos foi  $10,30 \pm 0,40$  g/L para as fermentações com nitrato de sódio e  $8,60 \pm 0,60$  g/L para aquelas com AMM. Apesar de o crescimento ser menor em AMM, a biomassa se manteve estável após 24 horas, com exceção da bactéria selvagem que continuou a crescer até o final da fermentação, já nos experimentos com NaNO<sub>3</sub> após 24 horas foi observado queda da biomassa (Fig. 4.7 a e b).

A síntese máxima de ramnolipídios da linhagem selvagem e dos mutantes **1B10**, **2A1** e **2B10**, em meio contendo nitrato de sódio, ocorreu em 24 horas, em seguida houve queda na concentração do biossurfactante. A produção da bactéria não modificada foi  $0,35 \pm 0,03$  g/L de ramnolipídios e a dos mutantes com maior produção, **2A1** e **2B10**, foi  $0,40 \pm 0,02$  g/L, ou seja, houve um pequeno aumento de 14% na produção. Já com *P. aeruginosa* LBI **4E3**, o biossurfactante foi produzido até 48 horas e então houve estabilização da síntese, a maior concentração obtida por este mutante,  $0,27 \pm 0,01$  g/L, foi menor do que a produção máxima da bactéria não modificada (Fig. 4.7 c).



**Figura 4.7** - Crescimento celular (g/L) e produção de ramnolipídios (g/L) da linhagem selvagem e quatro mutantes (*P. aeruginosa* LBI 1B10, 2A1, 2B10 e 4E3), utilizando borra de óleo de milho como fonte de carbono e NaNO<sub>3</sub> (a, c) e AMM (b,d) como fonte de nitrogênio.

Quando comparado à produção com nitrato de sódio observa-se que o emprego da AMM não causou mudança significativa na produção da linhagem selvagem ( $0,33 \pm 0,01$  g/L) e dos mutantes **1B10** ( $0,32 \pm 0,01$  g/L) e 4E3 ( $0,38 \pm 0,01$  g/L). Por outro lado, esta fonte de nitrogênio foi benéfica para os mutantes **2A1** e **2B10**, pois a síntese de ramnolipídios por estes micro-organismos, foi três vezes superior à da linhagem selvagem, alcançando  $0,993 \pm 0,02$  g/L e  $1,00 \pm 0,05$  g/L, respectivamente (Fig. 4.7 d). Não houve queda na concentração do produto durante a fermentação com AMM, diferente do ocorrido com NaNO<sub>3</sub>.

Os fatores de conversão produto / substrato (g Rhl (ramnolipídio) / g borra) e produto / biomassa (g Rhl / g célula) calculados para os mutantes e a linhagem selvagem crescidos em borra de óleo de milho, utilizando NaNO<sub>3</sub> e AMM como fontes de nitrogênio foram descritos na Tabela 4.6.

Analisando-se tais fatores observa-se que o mutante *P. aeruginosa* LBI **4E3**, em meio com NaNO<sub>3</sub> exibiu menor conversão, tanto do substrato como da biomassa, do que a linhagem selvagem, já *P. aeruginosa* LBI **2A1** e **2B10** apresentaram as maiores conversões, principalmente quando a fonte de nitrogênio foi a AMM.

**Tabela 4.6** - Fatores de conversão produto / substrato ( $Y_{p/s}$ ) e produto / biomassa ( $Y_{p/x}$ ) da linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e dos mutantes *P. aeruginosa* LBI **1B10**, **2A1**, **2B10** e **4E3** em fermentações com borra de óleo de milho como fonte de carbono (FC).

| LINHAGEM/<br>MUTANTE                 | $Y_{P/S}$         |              | $Y_{P/X}$         |              |
|--------------------------------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
|                                      | (g Rhl / g FC)    |              | (g Rhl / g cel)   |              |
|                                      | NaNO <sub>3</sub> | AMM          | NaNO <sub>3</sub> | AMM          |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI             | 0,018             | 0,017        | 0,035             | 0,035        |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1B10</b> | 0,018             | 0,017        | 0,034             | 0,039        |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2A1</b>  | <b>0,020</b>      | <b>0,050</b> | <b>0,041</b>      | <b>0,126</b> |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2B10</b> | <b>0,020</b>      | <b>0,050</b> | <b>0,040</b>      | <b>0,126</b> |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>4E3</b>  | 0,014             | 0,019        | 0,024             | 0,041        |

Em todas as fermentações onde se utilizou borra de óleo como fonte de carbono, obteve-se maiores taxas de conversão produto/biomassa ( $Y_{p/x}$ ) quando se utilizou água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, pura ou misturada ao nitrato de sódio; nestas condições, o metabolismo celular parece ter sido direcionado para a produção de ramnolipídios. Já com o uso de NaNO<sub>3</sub> puro, houve maior obtenção de biomassa, porém menor concentração de produto foi alcançada.

A velocidade com que essas fontes de nitrogênio são assimiladas pelo microrganismo é diferente. O nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é primeiramente reduzido a nitrito e este em amônia, que entra nas vias metabólicas para síntese de glutamato e glutamina (PAINTER, 1970). Esta fonte é rapidamente assimilada pelo microrganismo, o que favorece o seu crescimento. Já a água de maceração de milho contém nitrogênio, principalmente na forma de aminoácidos e polipeptídios, as proteínas devem ser hidrolisadas liberando aminoácidos, que junto com aqueles já presentes na AMM são transaminados ou oxidados por desidrogenases. O caminho para obtenção de nitrogênio é mais longo, quando se utiliza água de maceração como fonte deste nutriente. Tal condição pode criar limitação de nitrogênio para o microrganismo e assim favorecer a síntese de ramnolipídios.

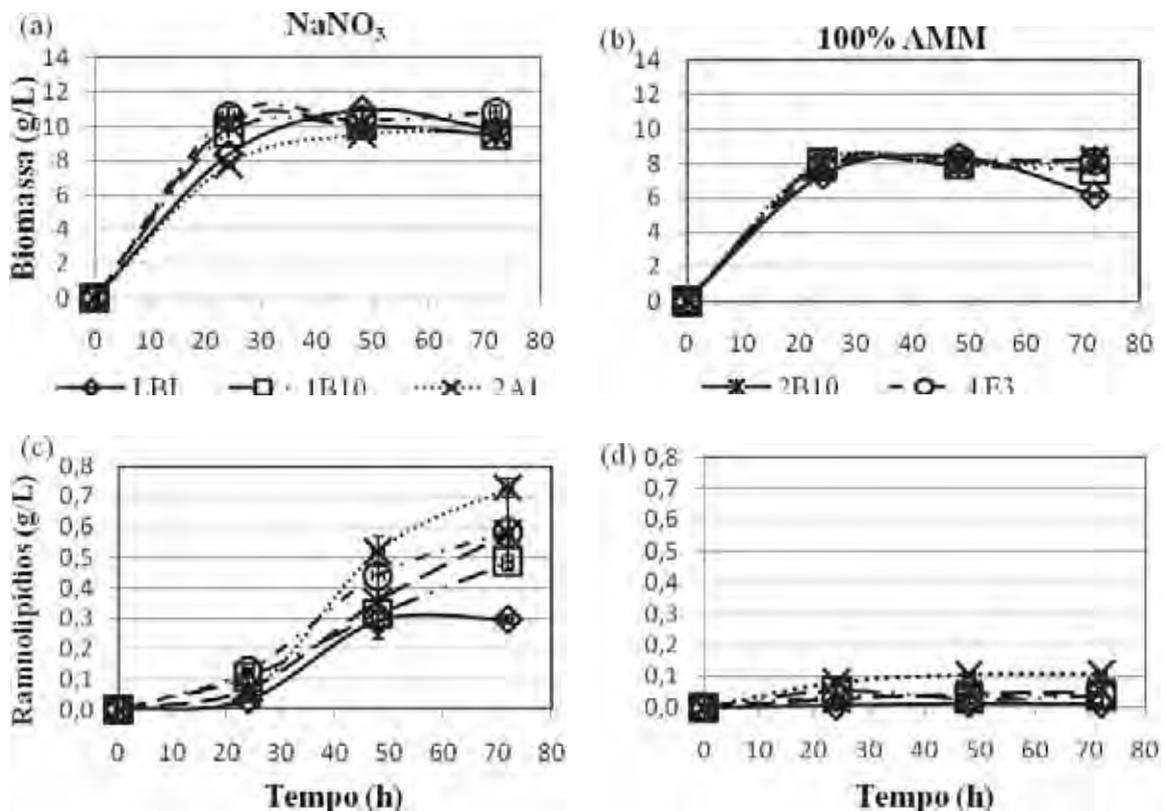
Além da condição de limitação de nitrogênio, o efeito benéfico da AMM para a produção de ramnolipídios, pode estar associado à manutenção do pH do meio de cultivo em torno da neutralidade. Este efeito tamponante deve-se à composição deste resíduo nitrogenado, ou seja, polipeptídios e aminoácidos. De acordo com Cardinal & Hedrick (1948), depois da hidrólise, 95% do total de nitrogênio presente na AMM é na forma de amônia e aminoácidos, dentre estes a histidina, que por possuir grupo R com pKa igual a 6, é capaz de exercer função tamponante significativa próxima ao pH neutro.

Outro fator que pode contribuir para o aumento da produção do biossurfactante é que durante o catabolismo dos polipeptídios e aminoácidos presentes na AMM, há liberação de esqueletos carbônicos que são disponibilizados para os microrganismos, contribuindo para o acúmulo de carbono no interior da célula, situação que associada a condições de limitação de nitrogênio pode favorecer a síntese de ramnolipídio (HOMMEL & RATLEDGE, 1993).

De acordo com Silva et al., (2010) a água de maceração de milho foi uma boa fonte de nitrogênio para produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* UCP0992, atingindo  $2,5 \pm 0,05$  g/L de biossurfactante, sendo considerada a segunda melhor fonte, dentre as sete avaliadas.

#### **4.3.2.2 Óleo de Mamona**

A seguir são descritos os resultados das fermentações conduzidas com os microrganismos descritos no item 4.3.2.1, porém utilizando óleo de mamona como fonte de carbono (Fig.4.8). A mudança da fonte de carbono para óleo de mamona não alterou o crescimento dos micro-organismos, quando se compara aos resultados descritos no item anterior. Em meio contendo  $\text{NaNO}_3$ , a biomassa média foi de  $10,60 \pm 0,80$  g/L, já com AMM obteve-se, em média,  $8,30 \pm 0,10$  g/L de células (Fig. 4.8 a, b).



**Figura 4.8** - Crescimento celular (g/L) e produção de rhamnolipídios (g/L) da linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e 5 mutantes (*P. aeruginosa* LBI 1B10, 2A1, 2B10 e 4E3), utilizando óleo de mamona como fonte de carbono e NaNO<sub>3</sub> (a, c) e AMM (b,d) como fonte de nitrogênio.

O perfil de produção de rhamnolipídios, em NaNO<sub>3</sub> e óleo de mamona, diferiu daquele já retratado. A síntese foi lenta nas primeiras 24 horas e acelerou quando a fase estacionária de crescimento dos micro-organismos foi atingida. Após 48 horas a linhagem selvagem cessou a produção, atingindo  $0,30 \pm 0,01$  g/L de rhamnolipídios. A concentração de rhamnolipídios sintetizada e o aumento da produção em relação à da *P. aeruginosa* LBI foi:  $0,49 \pm 0,02$  g/L – 63% para *P. aeruginosa* LBI 1B10;  $0,73 \pm 0,03$  g/L – 143% para *P. aeruginosa* LBI 2A1;  $0,58 \pm 0,06$  g/L – 93% para *P. aeruginosa* LBI 2B10 e  $0,59 \pm 0,10$  g/L – 97% para *P. aeruginosa* LBI 4E3 (Fig. 4.8 c).

A Figura 4.8 d apresenta os resultados da produção de rhamnolipídios da bactéria selvagem e dos mutantes 1B10, 2A1, 2B10 e 4E3 em meio de cultivo utilizando AMM como fonte de nitrogênio. A maior concentração de rhamnolipídios foi alcançada pelo mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1, com uma produção de 0,10 g/L, que é cerca de 8 vezes menor do que àquela obtida em meio contendo NaNO<sub>3</sub>. A potencial aplicação do óleo de mamona como fonte de carbono é confirmada pela biomassa alcançada pelos micro-

organismos avaliados. Os fatores de conversão produto/ substrato e produto/ biomassa referente às fermentações com óleo de mamona, são expressos na tabela 4.7.

**Tabela 4.7** - Fatores de conversão produto / substrato ( $Y_{p/s}$ ) e produto / biomassa ( $Y_{p/x}$ ) da linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e dos mutantes *P. aeruginosa* LBI **1B10**, **2A1**, **2B10** e **4E3** em fermentações com óleo de mamona como fonte de carbono.

| LINHAGEM/<br>MUTANTE                 | $Y_{P/S}$         |              | $Y_{P/X}$         |              |
|--------------------------------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
|                                      | (g Rhl / g FC)    |              | (g Rhl / g Cél)   |              |
|                                      | NaNO <sub>3</sub> | AMM          | NaNO <sub>3</sub> | AMM          |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI             | 0,015             | 0,001        | 0,030             | 0,002        |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>1B10</b> | 0,025             | 0,003        | 0,050             | 0,007        |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2A1</b>  | <b>0,040</b>      | <b>0,006</b> | <b>0,080</b>      | <b>0,013</b> |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>2B10</b> | 0,029             | 0,003        | 0,060             | 0,006        |
| <i>P. aeruginosa</i> LBI <b>4E3</b>  | 0,029             | 0,002        | 0,050             | 0,006        |

Os dois fatores de conversão calculados ( $Y_{p/s}$  e  $Y_{p/x}$ ) diferiram entre a linhagem selvagem e os mutantes avaliados, todos os mutantes foram mais eficientes que *P. aeruginosa* LBI. O destaque deve ser dado ao mutante **2A1**, cujos fatores de conversão  $Y_{p/x}$  foram 2,7 e 6,5 vezes superior aos da bactéria não modificada, nas fermentações com nitrato de sódio e AMM, respectivamente.

O perfil de produção de ramnolipídios com óleo de mamona como fonte de carbono foi diferente daqueles obtidos com o resíduo do processamento de óleos vegetais. A produção do biosurfactante diminuiu drasticamente na presença da AMM, entretanto os micro-organismos foram capazes de consumir tal fonte, já que o crescimento foi quantificado. Observa-se que o efeito negativo na produção pode ter ocorrido devido à interação das fontes de carbono e nitrogênio (óleo de mamona e AMM), pois quando utilizadas isoladamente em outras fermentações não foi detectado este efeito inibitório. Uma pequena produção do tensoativo ocorreu durante as primeiras 24 horas, em seguida a síntese é interrompida. Devido a este perfil, acredita-se que a inibição ocorra por causa dos subprodutos provenientes do catabolismo do óleo de mamona e AMM.

Outra hipótese é a de que a inibição ocorreu devido aos principais componentes da água de maceração de milho. Após a hidrólise dos polipeptídios presentes na AMM, os componentes encontrados em maior concentração são alanina (27%), amônia (12,7%) e arginina (8,23%) (CARDINAL e HEDRICK, 1948), dentre estas fontes de nitrogênio, duas

são conhecidas por inibir a síntese de ramnolipídios, a amônia e a arginina (Mulligan & Gibbs, 1989). Esse efeito inibitório pode não ter sido observado nas fermentações nas quais se utilizou borra de óleo (algodão, soja ou milho) como fonte de carbono, devido à presença de resíduos nitrogenados nestas fontes de carbono (DOWD et al., 1998; LOVAGLIO et al., 2010), que somado aos aminoácidos disponíveis na AMM, podem ter sobrepujado o efeito repressor da amônia e arginina na produção de ramnolipídios. Ainda, devido à presença de nitrogênio na borra, o microrganismo pode não ter hidrolisado completamente a AMM e dessa maneira, a concentração dos inibidores no meio foi menor. Há relatos na literatura de que o nitrogênio orgânico pode beneficiar o crescimento microbiano, porém é desfavorável para a produção de glicolipídios (WU et al., 2007; GUERRA-SANTOS et al., 1984).

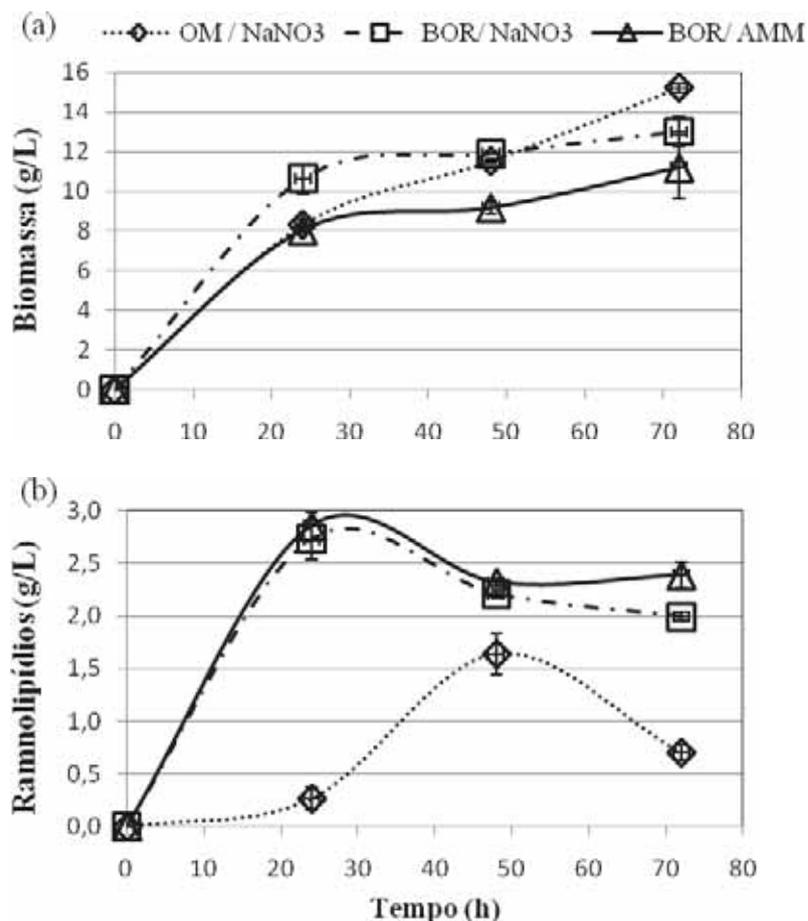
De acordo com os resultados, o mutante *P. aeruginosa* LBI **2A1** foi selecionado para dar continuidade aos experimentos, pois este micro-organismo alcançou as maiores concentrações de ramnolipídios em todas as condições avaliadas.

#### **4.3.2.3 Aumento da concentração das fontes de carbono**

A observação de que após 24 horas de cultivo o conteúdo residual de óleo era muito baixo nas fermentações realizadas com 2% da fonte de carbono; e ainda, o fato de que uma alta concentração de óleo no meio pode auxiliar no controle da formação de espuma, em fermentações conduzidas em biorreator, levou a realização de experimentos utilizando 250g/L da fonte de carbono.

Nesta etapa foram realizadas fermentações apenas com o mutante **2A1** com as seguintes associações de fonte de carbono e nitrogênio: BOM/NaNO<sub>3</sub>; BOM/AMM e OM/NaNO<sub>3</sub>. O intuito foi verificar qual seria a melhor condição para os experimentos a serem conduzidos em reator.

O mutante cresceu até 72 horas, nas três condições avaliadas; as biomassas atingidas foram 15,20 ± 0,20 g/L com OM//NaNO<sub>3</sub>; 13,00 ± 0,70 g/L com BOM/NaNO<sub>3</sub> e 11,20 ± 1,60 g/L com BOM/AM. O aumento na concentração da fonte de carbono favoreceu a obtenção de uma biomassa maior, este fato conseqüentemente contribui para o aumento na produção dos ramnolipídios (Fig. 4.9 a).

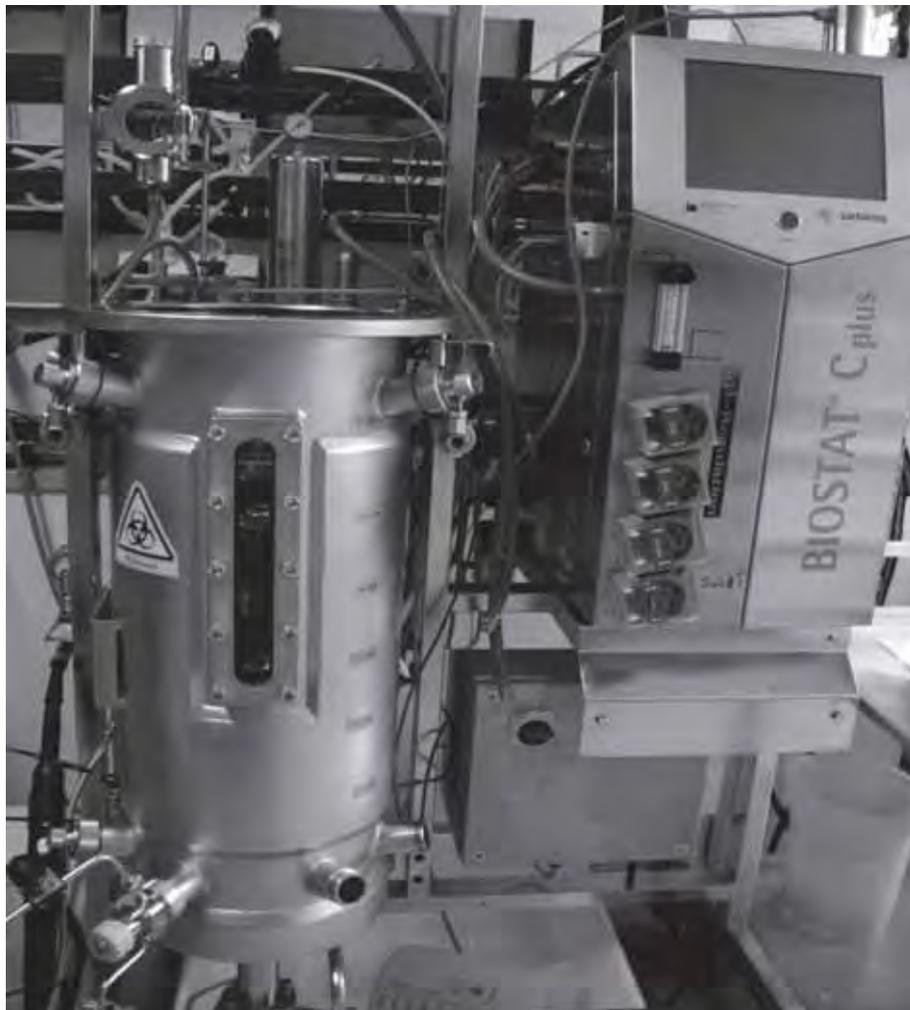


**Figura 4.9** - (a) Crescimento celular (g/L) e (b) produção de ramnolipídios (g/L) do mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando borra de óleo de milho e óleo de mamona como fontes de carbono e NaNO<sub>3</sub> e AMM como fontes de nitrogênio.

Em relação à produção do biossurfactante é nítido o efeito positivo que o aumento da concentração da fonte de carbono causou, nas três condições avaliadas, foi detectado aumento de 2 a 7 vezes na síntese de ramnolipídios quando comparamos aos resultados obtidos com as fermentações com 2% da fonte de carbono (Fig. 4.9 b). A fonte de carbono em excesso no meio de cultivo associado à queda na concentração de nitrogênio ou fósforo e/ou íons multivalentes direciona o metabolismo para a produção do glicolipídio (HOMMEL e RATLEDGE, 1993).

Nos experimentos com borra de milho houve uma intensa síntese de ramnolipídios nas primeiras 24 horas, já com óleo de mamona a produção foi lenta nesse período e se intensificou após 48 horas. As concentrações de ramnolipídios obtidas foram  $1,60 \pm 0,20$  g/L – OM/ NaNO<sub>3</sub>;  $2,70 \pm 0,20$  – BOM/ NaNO<sub>3</sub> e  $2,90 \pm 0,10$  – BOM/ AM.

**5. CAPÍTULO III**  
**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS EM BIORREATOR**



## 5.1 INTRODUÇÃO

Os ramnolipídios estão entre os mais efetivos surfactantes na remoção de compostos hidrofóbicos do solo (SANTA ANNA et al., 2007), podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, além de apresentarem excelente biodegradabilidade e compatibilidade ambiental. Entretanto, o preço atual dos ramnolipídios é cerca de US\$ 200/ Kg, uma solução à 20% e o produto com 98% de pureza é vendido por US\$ 6.000/ Kg (LEITERMANN 2010). Para tornar esse tensoativo competitivo no mercado dos surfactantes é essencial reduzir os custos de produção e aumentar sua produtividade (REIS et al., 2011).

O desenvolvimento de linhagens mutantes que apresentem alta produtividade é uma alternativa para conter essa situação, porém a complexidade da rede de regulação gênica envolvida na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* é um obstáculo ao desenvolvimento desses clones. Os circuitos de quorum sensing las e rhl são controlados por reguladores adicionais que ajustam as respostas desses sistemas, através de uma modulação compensatória (JUHAS et al., 2005). O entendimento do funcionamento dessa teia é de suma importância para o desenvolvimento de micro-organismos que apresentem elevada produção de ramnolipídios.

Um desafio enfrentado durante a produção aeróbica de biosurfactante é a formação de um grande volume de espuma, devido a agitação e aeração do caldo de cultivo (CHAYABUTRA et al., 2001; REILING et al., 1986). Uma alternativa a ser considerada é o emprego de quebrador mecânico de espuma, com a solução desse problema, pode-se aumentar o volume de trabalho do reator e evitar a perda de fermentações devido ao extravasamento de meio, o que além de prejuízos financeiros devido à perda de produtividade, aumenta os riscos de contaminação (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011).

Nesta etapa avaliou-se a produção de ramnolipídios em biorreator, além disso, buscou-se mutantes em uma biblioteca internacional, com o intuito de verificar a influência de determinados genes na produção de ramnolipídios.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Micro-organismos

A partir dos resultados obtidos nos capítulos anteriores selecionou-se o mutante *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 para dar continuidade nos experimentos em biorreator. Além do mutante citado foram realizadas fermentações com a linhagem selvagem (*P. aeruginosa* LBI) e 13 mutantes randômicos da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adquiridos da Universidade de Washington – Transposon Mutant Collection – Department of Genome Sciences. Os microrganismos adquiridos e os respectivos genes alterados são descritos na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** – Mutantes randômicos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e as respectivas alterações genéticas.

| Mutante                             | Característica   |
|-------------------------------------|--|
| <i>P. aeruginosa</i> PA1803 - lon   | Protease Lon::ISlacZ/hah                               |
| <i>P. aeruginosa</i> PA3387 - rhlG  | B-cetoacil redutase::ISphoA/hah                        |
| <i>P. aeruginosa</i> PA5058 – phaC2 | PHA sintase 2::ISphoA/hah                              |
| <i>P. aeruginosa</i> PA5255 - algQ  | Proteína regulatória AlgQ::ISlacZ/hah                  |
| <i>P. aeruginosa</i> PA3476 - rhlI  | Protein de síntese de autoindutor RhlI::ISphoA/hah     |
| <i>P. aeruginosa</i> PA2018 – mexY  | Transportador sistema de efluxo de drogas::ISphoA/hah  |
| <i>P. aeruginosa</i> PA2019 – mexX  | RND proteína de fusão::ISlacZ/hah                      |
| <i>P. aeruginosa</i> PA2020 - mexZ  | Regulador transcricional sistema de efluxo::ISlacZ/hah |
| <i>P. aeruginosa</i> PA1431 - rsaL  | Proteína regulatória RsaL::ISlacZ/hah                  |
| <i>P. aeruginosa</i> PA2258 - ptxR  | Regulador transcricional PtxR::ISlacZ/hah              |
| <i>P. aeruginosa</i> PA3622 - rpoS  | Fator sigma RpoS::ISlacZ/hah                           |
| <i>P. aeruginosa</i> PA4462 - rpoN  | Fator sigma 54 – RNA polimerase::ISphoA/hah            |
| <i>P. aeruginosa</i> PA3479 - rhlA  | ramnosiltransferase A::ISphoA/hah                      |
| <i>P. aeruginosa</i> PA5261 - algR  | proteína regulatóriaAlgR::ISphoA/hah                   |

## **5.2.2 Meios de cultura**

### **5.2.2.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF)**

Este meio foi utilizado para o preparo do inóculo das fermentações conduzidas em reator e também para realização de experimentos em frascos Erlenmeyer. Sua composição consiste em (g/L):  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,05; KCl - 0,1;  $\text{NaNO}_3$  - 1,5; óleo de girassol - 125; tampão fosfato 0,1M pH 6,5 e 1 mL/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g/L): citrato de sódio dihidratado - 2,0;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,28;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1,4;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 1,2;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 1,2;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,8.

### **5.2.2.2 Meio Mineral livre de cálcio (MLC)**

Para a produção de ramnolipídios em biorreator utilizou-se o seguinte meio (g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5; KCl - 1,0;  $\text{NaNO}_3$  - 15; óleo de girassol ou borra de óleo de milho - 250. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizada foram os mesmos descritos no item 5.2.2.1

A massa de reagente utilizada, nos meios descritos nos itens 5.2.2.1 e 5.2.2.2, foi baseada no volume de solução aquosa, não considerando o volume de óleo adicionado.

### **5.2.2.3 Caldo Nutriente (CN) e Luria Bertani (LB)**

A composição dos meios utilizados para o pré-cultivo dos micro-organismos em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona - 10; extrato de levedura - 5,0 e NaCl - 10 (LB).

## **5.2.3 Condições de cultivo**

### **5.2.3.1 Preparo do Inóculo**

Primeiramente os micro-organismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio LB e 100  $\mu\text{L}$  da cultura estoque da linhagem a ser avaliada, a incubação foi feita em mesa agitadora, durante 24 horas à 37°C e 120 rpm. Em seguida transferiu-se 5 mL do pré-cultivo para frascos de 1L com 200 mL de MLCTP e incubou-se por 24 horas à 37°C e 130 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação da fase aquosa resultando em uma  $\text{D.O}_{580\text{nm}}$  inicial de 0,1.

### 5.2.3.2 Experimento em Frasco – MLCTP

A avaliação do meio de cultivo (MLCTP/ Óleo de girassol) e dos mutantes da Universidade de Washington foi feita em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 50 mL de meio mineral e o inóculo adicionado de acordo com o que foi descrito (item 4.3.3.1.2). Os frascos foram incubados por 72 horas, à 130 rpm e 37°C. As amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise do crescimento e produção de ramnolipídios. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

### 5.2.3.3 Experimentos Biorreator

As fermentações foram realizadas em reatores de 2,5 L e 13 L (**Minifors** – Infors HT – Suíça) e 42 L (**Biostat Cplus** - Sartorius Stedium Biotech, Alemanha) com capacidade nominal de 0,7; 5,0 e 30 L, respectivamente. Os fermentadores eram equipados com sensores para controle de temperatura, pH, pO<sub>2</sub>, fluxo de ar e espuma.

#### 5.2.3.3.1 Infors 2,5 e 13L

No reator de menor volume utilizou-se 550 mL da fase aquosa (meio MLC) acrescido de 137,5 g de óleo de girassol, o que corresponde à aproximadamente 150 mL ( $\rho = 0,877 \text{ g/cm}^3$ ), totalizando 0,7 L. Os parâmetros físico-químicos adotados foram: aeração – 0,4 L/min; temperatura – 37°C; pH –  $6,8 \pm 0,1$ ; a velocidade de agitação aumentou de 400 até 1000 rpm, sendo ajustada para manter a pO<sub>2</sub> acima de 10%; o volume de espuma formada foi controlado através do antiespumante Contraspum A4050 (Zschimmer & Schwarz GmbH & Co. KG).

Nas fermentações conduzidas em reator de 13L, o volume de fase aquosa foi 4,0 L ao qual se adicionou 1,0Kg de óleo de girassol. Os parâmetros físico-químicos foram idênticos, com exceção da taxa de aeração que foi de 2,0 L/min.

Adicionou-se solução de elementos traços à fermentação nos seguintes tempos de cultivo: 0, 20, 40, 70 e 120 h. As amostras foram retiradas duas vezes ao dia para análise da biomassa, consumo de óleo e nitrogênio e produção de ramnolipídios.

### 5.2.3.3.2 Biostat Cplus

O volume utilizado foi 15L da fase aquosa (meio MLC) acrescido de 3750 g de óleo de girassol, o que corresponde à aproximadamente 4,2 L ( $\rho = 0,877 \text{ g/cm}^3$ ), totalizando 19,2 L. Os valores dos parâmetros físico-químicos adotados foram: temperatura 37°C; pH  $6,8 \pm 0,1$ ; a taxa de aeração variou de 0,1 à  $3,3 \text{ L/L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (relacionada ao volume de fase aquosa 15L), sendo ajustada para manter o oxigênio dissolvido acima de 5% e agitação de 400 rpm.

A espuma foi controlada por um quebrador mecânico de espuma acoplado à tampa do reator (Fig. 5.1). Este quebrador era ativado automaticamente quando o volume de espuma atingia a escala de 35 L do fermentador (aproximadamente 15 L de espuma). Adicionou-se solução de elementos traços à fermentação nos seguintes tempos de cultivo: 0, 20, 40, 70 e 120 h.

As amostras foram retiradas três vezes ao dia para análise da biomassa, consumo de óleo e nitrogênio e produção de ramnolipídios. Os parâmetros online como pH,  $pO_2$ , produção de  $CO_2$  e consumo de oxigênio foram controlados até o período entre 160 e 165 horas de fermentação.



**Figura 5.1** - Quebrador mecânico de espuma acoplado ao fermentador Biostat Cplus - 421

## **5.2.4 Métodos Analíticos**

### **5.2.4.1 Processamento das amostras**

O volume de cada amostra foi 5 e 20 mL nos experimentos em frasco e reator, respectivamente. As amostras provenientes dos reatores foram divididas em duas de 10 mL. Prosseguiu-se misturando n-hexano às amostras (1:1) e agitando vigorosamente por 1 minuto, a mistura foi centrifugada à 4000 rpm, 4°C e 30 min para que houvesse separação das 3 fases: células / fase aquosa / n-hexano.

### **5.2.4.2 Avaliação da produção de Ramnolipídios**

#### **5.2.4.2.1 Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada**

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar se houve produção de ramnolipídios antes de prosseguir às análises em HPLC. Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte mistura: clorofórmio / metanol / ácido acético (65:15:2). O agente revelador utilizado foi a seguinte mistura 2 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico. As amostras consistiram em 10 µL de extratos de ramnolipídios obtidos, a partir do caldo livre de células, em diferentes tempos de fermentação, além dos padrões de ramnolipídios obtidos pela Jeneil Biosurfactant Company, USA.

#### **5.2.4.2.2 Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC**

##### **1. Derivatização**

Para que os ramnolipídios fossem analisados via detector UV, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com o que foi descrito por Schenk et al., (1995), com pequenas modificações. As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360 µL de acetonitrila e 40 µL da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40mM e Trietilamina 20mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um termomixer (*Thermomixer* comfort, Eppendorf AG).

## 2. HPLC

As análises foram feitas com um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV. Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio nas seguintes concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g/L. Para as análises utilizou-se uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC18, Supelco - 150 mm x 4.6 mm, 5 µm sílica gel) à 30°C. As fases móvel foram Solução A com 5% de metanol e Solução B com 95%, ambas em água ultra pura. Para que houvesse separação dos homólogos presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 à 100% da Solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da sol. B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida ocorreu um decréscimo para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm. Os tempos de retenção foram  $21,5 \pm 0,1$  min pra Rha-Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>  $22,2 \pm 0,1$  min para Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>.

### 5.2.4.3 Determinação da biomassa microbiana

Após a separação das 3 fases (item 5.2.4.1) o pellet de células foi ressuspensão em NaCl 0,85% (v/v) (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 4000 rpm, 4°C e 30 min. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantidos em estufa à 100°C até atingir peso constante.

### 5.2.4.4 Determinação do óleo residual

A fase de n-hexano foi usada para determinação gravimétrica das concentrações de óleo, depois da evaporação do solvente.

### 5.2.4.5 Determinação do consumo de nitrogênio

A partir da fase aquosa determinou-se o consumo da fonte de nitrogênio nos diferentes tempos de fermentação. O kit Spectroquant (Merck KGaA) foi utilizado para a quantificação de nitrato presente na amostra.

### 5.2.4.6 Confirmação da Inserção do Transposon

Com a finalidade de verificar a presença do transposon no genoma da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, foram construídos os seguintes primers complementares à sequência do elemento transponível:

FP- GGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGG  
RP-CTCAAAATCTCTGATGTTACATTGC

Em seguida foi feito um PCR de colônia da linhagem selvagem e da linhagem a ser verificada a inserção, como controle positivo (C+) utilizou-se o transposon do kit EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre), o qual foi usado no processo de mutação.

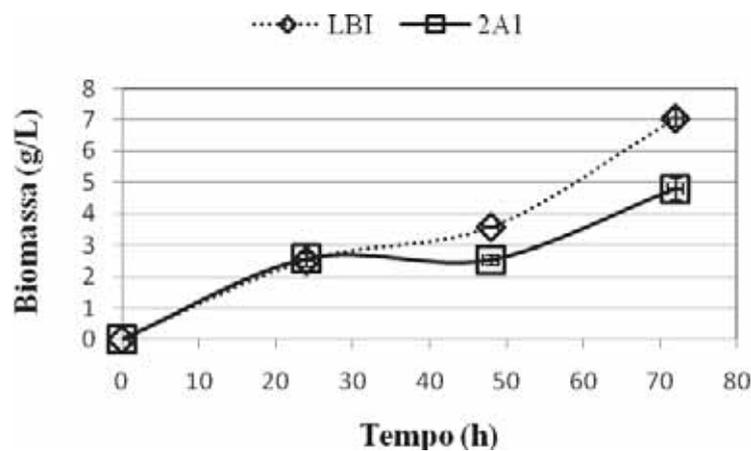
Primeiramente os micro-organismos foram inoculados em ágar nutriente, as placas foram mantidas em BOD por 24 horas a 35°C. Com o auxílio de palitos de dentes autoclavados, 2 a 3 colônias isoladas da linhagem teste foram dissolvidas em 20 µL de uma solução contendo: 20µL de dNTP, 16µL de MgCl<sub>2</sub>, 20µL de tampão fosfato, 2µL de cada primer (F e R), 0,2µL de taq polimerase e 140µL de água ultra pura.

Para amplificação do DNA foi utilizado PCR “touch down” com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C/ 3min, seguido de 15 ciclos de 94°C/30 seg , gradiente de 68 - 55°C/ 30 seg (diminuição de um grau a cada ciclo) e 70°C/2 min. Finalmente, realizou-se 30 ciclos de 94°C/30´´, 55°C/30´´ e 70°C/2min para multiplicação das bandas inicialmente isoladas no touch down.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF) / Óleo de Girassol

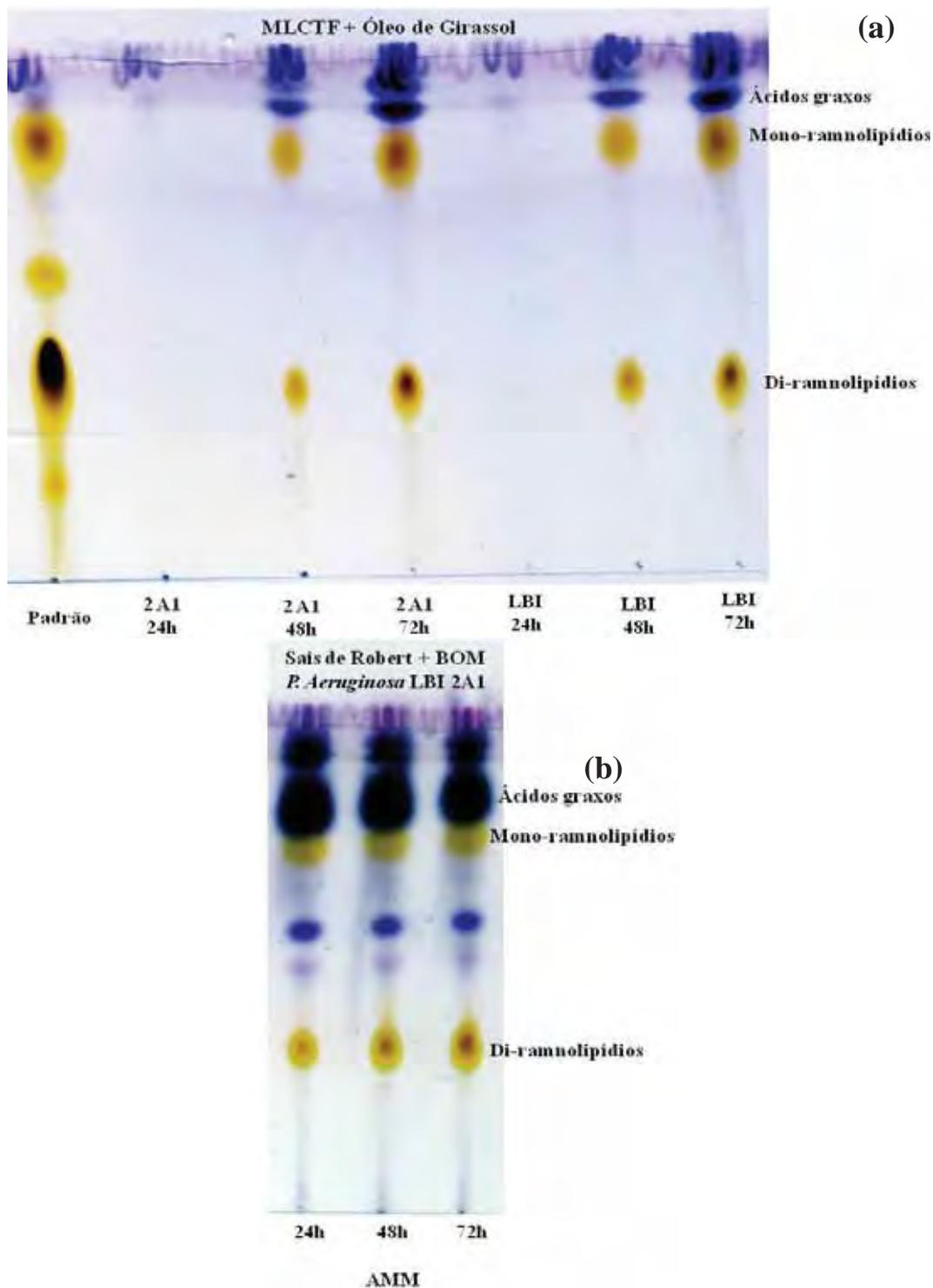
Antes de iniciar as fermentações em biorreator testou-se a habilidade da bactéria selvagem e do mutante *P. aeruginosa* LBI **2A1** em crescer no meio livre de cálcio (MLCTF), utilizado no laboratório do Prof. Rudolf Hausmann (Universidade de Karlsruhe) para produção de ramnolipídios. A Fig. 5.2 exibe os resultados relacionados ao crescimento das linhagens, neste meio mineral.



**Figura 5.2** - Crescimento celular (g/L) da linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e do mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1, em fermentações utilizando meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF).

Ambas as linhagens cresceram neste meio mineral utilizando óleo de girassol como fonte de carbono. A biomassa da linhagem selvagem,  $7,0 \pm 0,2$  g/L, foi maior do que a do mutante 2A1 que atingiu  $4,3 \pm 0,3$  g/L.

Apesar do mutante 2A1 ter crescido menos do que a bactéria controle, a produção de ambos parece ter sido próximas. A presença dos spots de ramnolipídios (mono- e di-) confirma a possibilidade de utilizar tal meio para conduzir as fermentações em biorreator (Fig. 5.3a). Estes resultados indicam que, para as duas linhagens utilizadas, a produção de di-ramnolipídios foi menor do que a de mono-ramnolipídios.



**Figura 5.3** - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de rhamnolipídios **(a)** pela linhagem selvagem e mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1, em meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF) e óleo de girassol como fonte de carbono **(b)** mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando o meio salino descrito por Robert et al., (1989) e borra de óleo de milho (BOM) como fonte de carbono.

Ao compararmos os spots provenientes das fermentações com MLCTF (5.3a) e Sais de Robert (SR) (5.3b) verifica-se que a produção de ramnolipídios, pela linhagem mutante, após 72 horas de fermentação, foi equivalente para di-ramnolipídios, já a síntese de mono-ramnolipídio foi maior no meio em que se utilizou óleo de girassol como fonte de carbono.

Observa-se que o período de indução da biossíntese foi menor com SR e BOM, pois com 24 horas de fermentação foi possível a detecção de homólogos no caldo livre de células, entretanto após este período o aumento na concentração de ramnolipídios foi pequeno, como pode ser constatado pelo discreto aumento nas dimensões dos spots. Já com MLCTF a produção manteve-se crescente até o final do experimento.

### 5.3.2 Experimentos em Biorreator

#### 5.3.2.1 Minifors

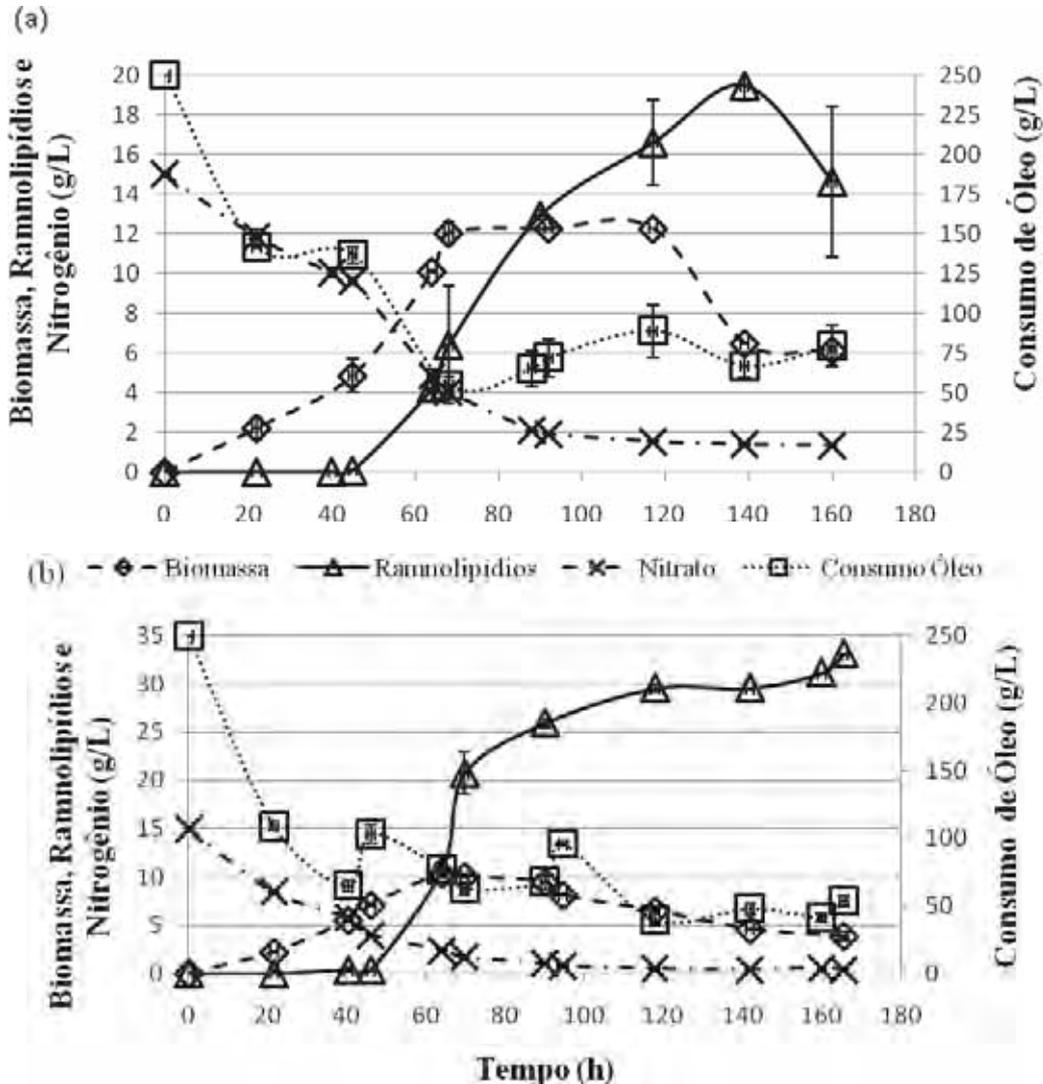
As fermentações em biorreator foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado no laboratório de biologia técnica da Universidade de Karlsruhe. O mutante selecionado e o micro-organismo controle foram avaliados em meio salino livre de cálcio e óleo de girassol como fonte de carbono.

A seguir são apresentados os resultados da bactéria selvagem *P. aeruginosa* LBI e do mutante *P. aeruginosa* LBI **2A1** obtidos a partir de fermentações conduzidas em bioreatores de 2L (Fig. 5.4).

O micro-organismo controle cresceu até 68 horas de fermentação, atingiu  $12,0 \pm 0,5$  g/L de células e entrou na fase estacionária de crescimento, nesta etapa ainda havia  $54,5 \pm 5,0$  g/L de óleo de girassol e  $4,0 \pm 0,4$  g/L de nitrato no meio de cultivo, a fonte de nitrogênio continuou a ser consumida e no final da fermentação havia  $1,3 \pm 0,1$  g/L. A produção de ramnolipídios foi iniciada após 45 horas e atingiu a concentração máxima,  $19,5 \pm 0,7$  g/L, após 140 horas, em seguida houve queda na concentração de ramnolipídios (Fig. 5.4 a).

Os resultados obtidos com o mutante *P. aeruginosa* LBI **2A1** foram apresentados na Fig. 5.4b. A biomassa foi máxima com 64 horas de fermentação atingindo  $10,4 \pm 0,2$  g/L de células. O conteúdo da fonte de carbono e nitrogênio nesta etapa era  $77,8 \pm 5,0$  e  $2,4 \pm 0,1$  g/L, respectivamente. A produção de ramnolipídios iniciou lentamente em 40 horas e acelerou após 46 horas, a etapa de maior síntese ocorreu entre 46 e 69 horas, após este

período houve desaceleração, porém a concentração de ramnolipídios continuou a aumentar até o final da fermentação, atingindo  $33,1 \pm 0,4$  g/L do produto.



**Figura 5.4** - Crescimento celular (g/L), produção de ramnolipídios (g/L), consumo de óleo e nitrogênio da linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI (a) e do mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 (b) utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.

O aumento na produção em relação à *P. aeruginosa* LBI foi de 70%, confirmando o potencial dessa linhagem para a produção comercial de biossurfactante. Além disso, observa-se que a bactéria selvagem apresenta queda na produção após 140 horas, e o mutante 2A1, ao contrário, continuou a síntese até o final das fermentações.

As proporções di- / mono-ramnolipídios nas fermentações com a bactéria selvagem, variou de 1,0 à 1,3 nos diferentes tempos de fermentação; já com o mutante 2A1 a variação

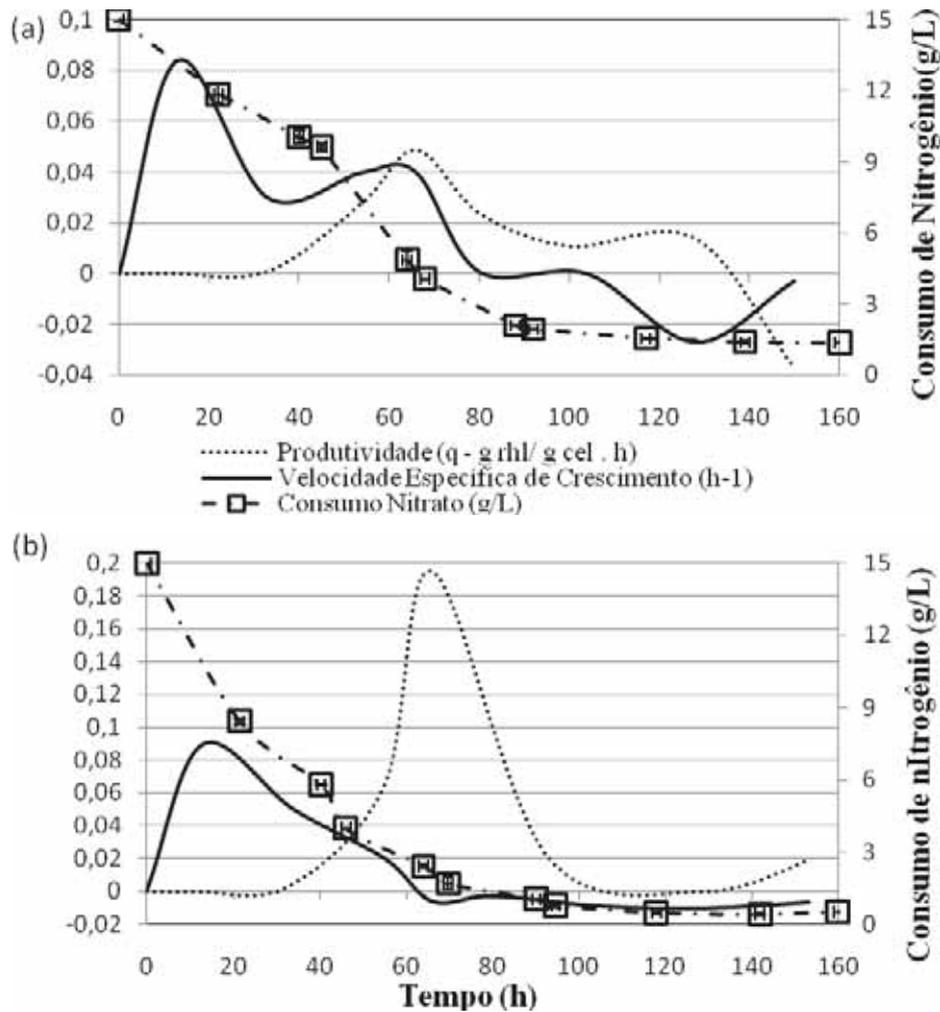
foi menor, até 70 horas de fermentação a produção dos homólogos foi equivalente, após este período os di-ramnolipídios foram sintetizados em maior concentração com um aumento de 10% na produção deste homólogo (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2** – Variação da proporção di- / mono-ramnolipídios produzida pela linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e o mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 durante a fermentação em biorreator (22 à 160 horas)

| TEMPO (h) | PROPORÇÃO DI- / MONO RAMNOLIPÍDIOS |                              |
|-----------|------------------------------------|------------------------------|
|           | <i>P. aeruginosa</i> LBI           | <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 |
| 22        | ----                               | 1                            |
| 40        | 1                                  | 1                            |
| 45        | 1                                  | 1                            |
| 65        | 1                                  | 1                            |
| 70        | 1,1                                | 1                            |
| 90        | 1,3                                | 1,1                          |
| 120       | 1,3                                | 1,1                          |
| 140       | 1,1                                | 1,1                          |
| 160       | 1,2                                | 1,1                          |

O óleo de girassol, utilizado como fonte de carbono, é predominantemente composto por ácido linoléico e oléico, na forma de triglicerídeos (GUPTA, 2002). Durante a metabolização desse composto hidrofóbico, ocorre a produção de lipases, que hidrolisam as ligações do triglicerídeo, liberando ácidos graxos e glicerol (SHABTAI; DAYA-MISHNE, 1992). O aumento na síntese de di-ramnolipídio, um homólogo mais hidrofílico quando comparado ao mono-ramnolipídio, pode ter ocorrido para auxiliar a metabolização do glicerol e dos ácidos graxos de cadeia curta que são liberados no meio de cultivo.

A Fig. 5.5 mostra os valores de velocidade específica de crescimento ( $\mu - h^{-1}$ ), produtividade específica ( $q - g \text{ rhl} / g \text{ cél} \cdot h$ ) e consumo de nitrogênio (g/L) ao longo do tempo, para a linhagem selvagem (5.5 a) e o mutante 2A1 (5.5 b).



**Figura 5.5** - Velocidade Específica de Crescimento (g/L.h) e produtividade de ramnolipídios (g rhl/ g cél. h) da linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI (a) e do mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 (b).

As maiores taxas de crescimento alcançadas por cada micro-organismo foram próximas,  $0,084 \text{ h}^{-1}$  para *P. aeruginosa* LBI e  $0,09$  para o mutante 2A1. A diferença é que a velocidade de crescimento da linhagem selvagem cai após 13 horas, porém tende a estabilizar-se no período entre 30 e 60 horas, já o mutante após atingir a velocidade máxima, não apresenta estabilização, somente diminuição da taxa de crescimento. De acordo com este perfil de crescimento, constata-se que as condições adotadas nestas fermentações foram mais limitantes para o mutante do que para a linhagem selvagem.

O meio de cultivo utilizado nessas fermentações caracteriza-se pela ausência de cálcio em sua composição. A disponibilidade restrita de íons multivalentes, como o cálcio, estimula a expressão de genes relacionados à produção de ramnolipídios. O sistema regulatório de dois componentes PhoP–PhoQ é ativado na presença de baixas

concentrações de cátions divalentes, como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , esse sistema está associado ao desenvolvimento de resistência à antibióticos e o sensor quinase PhoQ modula a virulência em *P. aeruginosa* (McPHEE et al., 2006; GOODERHAM et al., 2009).

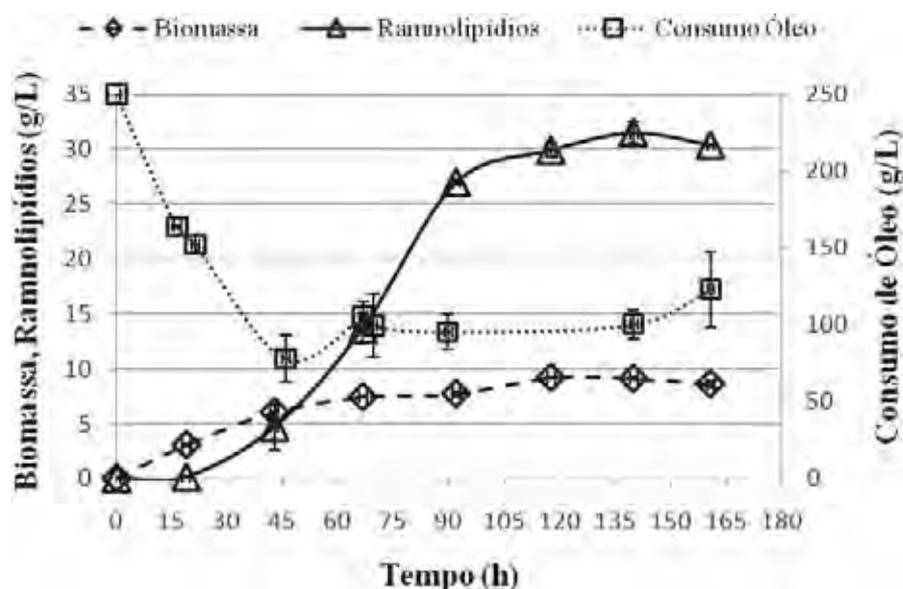
A adição de cálcio ao meio de cultivo propiciou o aumento da espessura de biofilmes formado por *P. aeruginosa*, além disso, foi detectado aumento na produção de proteases, alginato e piocianina (SARKISOVA et al, 2005). A produção de piocianina e ramnolipídios podem ser reguladas antagonicamente, mutações no regulador de estresse oxidativo OxyR, causou um aumento de 2 a 3 vezes na produção de piocianina, porém observou-se decréscimo significativo na síntese de ramnolipídios (VINCKX et al., 2010). O controle antagônico da produção de piocianina e ramnolipídios, associado ao fato de que a adição de cálcio aumenta a síntese do pigmento, pode explicar o porquê dos benefícios causados pela ausência desse cátion para a produção do biossurfactante.

Em relação à produtividade específica de ramnolipídios, houve uma nítida diferença entre as linhagens avaliadas. A produtividade máxima da bactéria selvagem foi 0,05 g rhl / g cél., enquanto a do mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 foi quatro vezes maior, 0,2 g rhl / g cél . h. A linhagem mutante produziu em 30 horas a mesma concentração de ramnolipídios sintetizada pela linhagem selvagem em 100 horas de fermentação. Em ambos os cultivos ainda havia nitrogênio em excesso no meio quando se iniciou a síntese de ramnolipídios.

### 5.3.2.2 Biostat Cplus

Foi realizada uma fermentação com o mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 no reator de 42 L, acoplado com quebrador mecânico de espuma. Este aparato foi eficiente no controle da espuma, já que não foi necessário a adição de anti-espumante na fermentação. Quando a espuma alcançava o volume de 35L do reator, o quebrador era acionado e atuando como uma centrífuga promovia a quebra da espuma e conseqüente redução do volume.

Os resultados obtidos neste experimento foram apresentados na Fig. 5.6; a biomassa máxima do micro-organismo foi  $9,20 \pm 0,05$  g/L de células em 118 horas de fermentação. A concentração residual de óleo foi mais alta, quando comparamos às fermentações nos reatores pequenos.



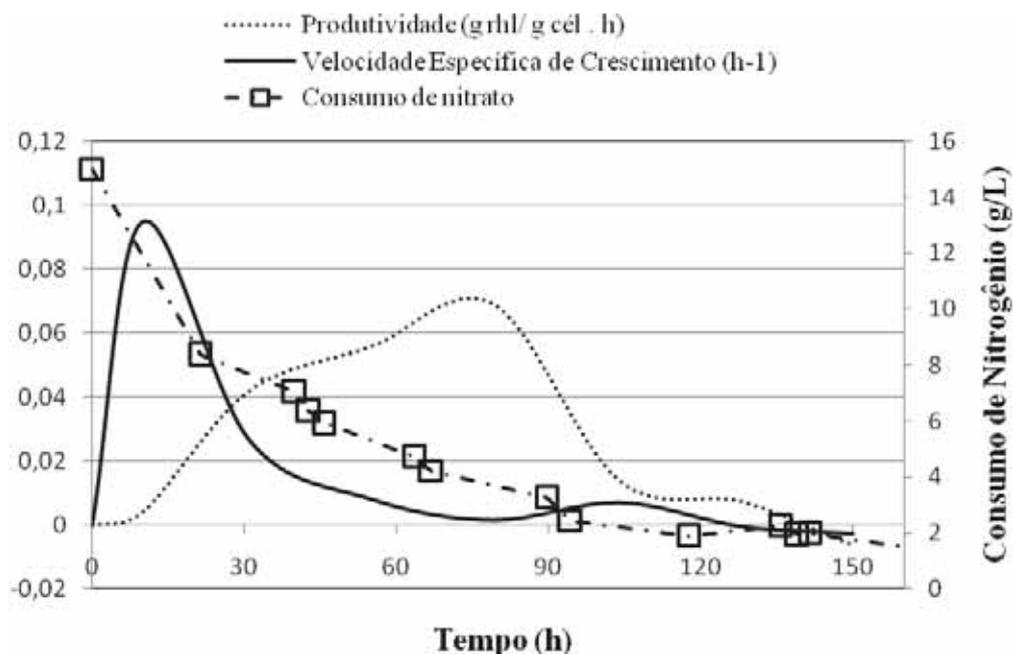
**Figura 5.6** - Crescimento celular (g/L), produção de ramnolipídios (g/L), consumo de óleo do mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 (a) utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.

A produção de ramnolipídios iniciou-se após 19 horas de fermentação, manteve-se acelerada até 90 horas e atingiu a concentração máxima,  $31,5 \pm 1,0$  g/L, em 140 horas. A concentração de ramnolipídios obtida nesta fermentação foi semelhante àquela dos reatores pequenos, porém os perfis de produção foram diferentes.

Nas fermentações conduzidas nos reatores pequenos, o produto só foi detectado no meio após 40 horas e ainda em baixa concentração, o período acelerado de síntese durou aproximadamente 23 horas, apesar da desaceleração, o mutante continuou a produzir ramnolipídios até o final do experimento. No reator de maior dimensão (Biostat Cplus), a síntese iniciou-se 21 horas antes e o período de produção intensa perdurou por 45 horas, após o término desta fase foi sintetizado apenas 4,5 g/L de ramnolipídios.

A seguir são apresentados os resultados de velocidade específica de crescimento, produtividade específica e consumo de nitrogênio para a fermentação conduzida em reator de 42L com o mutante 2A1 (Fig. 5.7).

O  $\mu_{\text{máx}}$  do mutante nesta fermentação foi  $0,095 \text{ h}^{-1}$ , a produção de ramnolipídios já havia sido iniciada quando o micro-organismo atingiu a velocidade máxima de crescimento e neste momento havia alta concentração de nitrogênio no meio, confirmando os resultados já descritos.



**Figura 5.7** - Velocidade Específica de Crescimento (g/L.h) e produtividade de ramnolipídios (g rhl/ g cél . h) do mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1.

A produtividade máxima de ramnolipídios foi 0,07 g rhl / g cél . h, o período de produção foi caracterizado como longo, cerca de 130 h. Observa-se que ocorre aumento da produtividade específica após o micro-organismo atingir o  $\mu_{\text{máx}}$ . Assim como os resultados anteriores, o perfil de produção caracteriza-se como parcialmente associado ao crescimento, contrariando a caracterização dos ramnolipídios como metabólitos secundários (BANAT et al., 2000).

Nas condições experimentais adotadas para este trabalho, a síntese de ramnolipídios iniciou-se antes da fase estacionária de crescimento e foi considerado parcialmente associado ao crescimento porque a produtividade máxima e  $\mu_{\text{máx}}$  não foram concomitantes. A produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* UCP0992, utilizando glicerol como fonte de carbono, foi caracterizada como sendo associada ao crescimento (SILVA et al., 2010), comprovando que o perfil de produção desses compostos nem sempre o caracteriza como um metabólito secundário.

Os resultados obtidos por Duan e Surette (2007) indicam que de acordo com as condições de cultivo há grande variação nos valores da densidade celular, onde ocorre a ativação da expressão dos autoindutores (Homoserina Lactona - HSL) e atividade máxima dessas moléculas relacionadas à síntese de ramnolipídios, indicando que não é possível estabelecer correlação entre a densidade celular e a expressão dos genes regulados via quorum sensing.

Em todos os cultivos conduzidos em biorreator, foi observada a presença de nitrogênio em excesso, concomitantemente ao início da síntese de ramnolipídios e mesmo quando os valores máximos de produtividade específica foram alcançados. Esta observação vai contra a idéia da necessidade de limitação de nitrogênio para que ocorra a produção desse composto (GUERRA-SANTOS et al., 1984; MANRESA et al., 1991; ARINO et al., 1996).

O mesmo perfil foi observado por Müller et al., (2011), o autor relata que a limitação de outros nutrientes podem ter favorecido a produção de ramnolipídios. Duan e Surette (2007) relatam a possibilidade dos reguladores de expressão, como fator sigma RpoN que está envolvido no metabolismo do nitrogênio, comportarem-se diferentemente de acordo com as condições do meio, alterando, dessa forma a expressão de genes regulados via quorum sensing. Dessa maneira, a produção de ramnolipídios pode ocorrer mesmo em condições onde não há limitação de nitrogênio.

De acordo com Lang & Wullbrandt, (1999) a pré-condição essencial para a alta produção de ramnolipídios é a limitação do crescimento, que se obtém através da limitação de alguns nutrientes e íons multivalentes, contudo é necessário que a fonte de carbono esteja presente em excesso.

O sistema de dois componentes PhoR-PhoB conecta fatores ambientais, densidade celular e produção de metabólitos secundários em *P. aeruginosa* (JENSEN et al., 2006). Esse sistema é ativado em condições de baixa concentração de fósforo inorgânico, e como consequência ativa a expressão do regulador de resposta, RhlR, do sistema de quorum-sensing rhl (REIS et al., 2011), evidenciando que outros componentes, além do nitrogênio, podem influenciar a síntese de ramnolipídios.

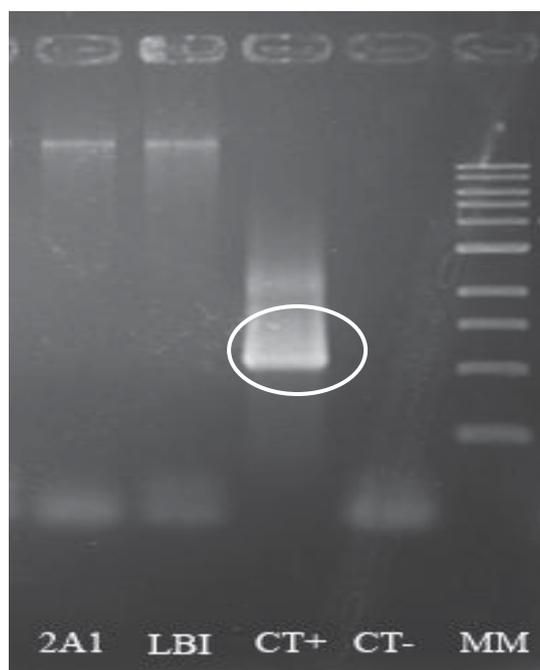
A observação dos resultados obtidos exhibe a complexidade da regulação da síntese de ramnolipídios pelo sistema de quorum-sensing. Duan e Surette (2007) demonstraram que a expressão dos dois principais sistemas de quorum-sensing, presente em *P. aeruginosa*, *las* e *rhl*, varia significativamente de acordo com as condições de cultivo. Tanto o tempo relativo como a magnitude da expressão foram sensíveis às condições de crescimento avaliadas. Esta observação nos permite inferir que a variação de resultados obtidos está relacionada aos sistemas de controle da expressão gênica encontrados nestas linhagens.

É importante a execução de pesquisas que definam claramente o papel dos ramnolipídios nas células das linhagens produtoras, pois esta função pode ser um dos

fatores determinantes para os diferentes perfis de produção encontrados, sendo ora um típico metabólito secundário e em outras condições de cultivo sua produção é parcial ou totalmente associada ao crescimento do micro-organismo.

### 5.3.2 Verificação da Inserção do Transposon

Após a seleção do mutante de interesse, *P. aeruginosa* LBI 2A1, realizou-se testes para verificar se a inserção do transposon Tn5 no genoma da bactéria selvagem seria responsável pelo aumento na produção de ramnolipídios (Fig. 5.8)



**Figura 5.8** – PCR para verificar a presença do transposon tn5 no cromossomo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

A banda correspondente à amplificação do transposon só está presente no controle positivo, ou seja, não houve inserção no cromossomo de *P. aeruginosa* LBI. A bactéria *P. aeruginosa* LBI 2A1 apresentou um aumento de 70% na síntese de ramnolipídios quando comparada à linhagem selvagem, esta observação nos permite inferir que houve alteração genética nesta bactéria, porém não foi possível determinar o local exato da mutação. Outra diferença em relação à *P. aeruginosa* LBI, é a baixa capacidade de consumo de glicerol pela bactéria mutante, que apresentou queda no crescimento em concentrações crescentes dessa fonte de carbono, fato não observado com a linhagem selvagem.

O plaqueamento dos micro-organismos após o procedimento de eletroporação foi feito em doses elevadas de canamicina (600 e 700 µg/mL), um antibiótico da classe dos

aminoglicosídeos. Tais concentrações podem ter sido o fator determinante da alteração genética da linhagem de *P. aeruginosa* LBI. De acordo com Gooderham e Hancock (2009), a versatilidade de *P. aeruginosa* é mediada em parte pelo grande repertório de sistemas regulatórios de dois componentes, que dentre outras funções, são responsáveis pelo controle da resistência a antimicrobianos e/ou fatores de virulência. Portanto é possível estabelecer uma correlação entre o aumento na produção de ramnolipídios, considerados fator de virulência, e a elevada resistência à canamicina encontrada em *P. aeruginosa* LBI **2A1**.

As principais características que conferem resistência a múltiplos antibióticos em *P. aeruginosa* são baixa permeabilidade da membrana externa e ativo sistema de efluxo de antibióticos (HANCOCK; SPEERT, 2000).

Em *Salmonella* a permeabilidade reduzida da membrana externa é associada à regulação feita pelo sistema de dois componentes PhoP-PhoQ, cuja indução ocorre em baixas concentrações de cátions divalente. Este sistema controla os reguladores PmrA-PmrB, que por sua vez ativa o operon *arnBCADTEF*, responsável pela adição de 4-aminoarabinose ao lipídio A de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa, alterando a permeabilidade das células a antibióticos catiônicos (McPHEE et al., 2003; GUNN e MILLER, 1996; SONCINI e GROISMAM, 1996).

O sistema de dois componentes citado acima é encontrado em *P. aeruginosa* e sob baixas concentrações de íons  $Mg^{2+}$  é responsável pela superexpressão do operon *oprH-phoP-phoQ* e outros operons, Essa ativação promove o aumento da resistência à antimicrobiano catônicos, bem como, os aminoglicosídeos (MacFARLANE et al., 2000). Portanto, é possível que a resistência à aminoglicosídeos em *Pseudomonas aeruginosa*, envolva modificações similares no LPS da membrana externa, já que estes são os alvos primários para a ligação de aminoglicosídeos antes de sua passagem pela membrana externa de *P. aeruginosa* (SAIKA et al., 1999; BRYAN et al., 1984; GALBRAITH et al., 1984)

O ponto de ligação entre a resistência a antibióticos e a produção de ramnolipídios reside no fato de que *phoQ* além de estar associado ao aumento da resistência à aminoglicosídeos; também regula positivamente o movimento de natação de *P. aeruginosa*, constatado pelos estudos de Brinkman et al., (2001), onde mutantes nocauteados em *phoQ* não apresentaram movimentação desse tipo. De acordo com Déziel et al., (2003) essa forma de translocação exibida por *P. aeruginosa*, requer a produção de

agentes tensoativos, como os ramnolipídios e ácidos 3-hidroxi-alcanóicos, que reduzem a tensão superficial facilitando o movimento celular, portanto a perda de mobilidade observada por Brinkman et al. (2001), pode ser consequência da inibição da síntese de ramnolipídios.

Os sistemas de efluxo de antibióticos em *P. aeruginosa* são compostos por três partes, sendo um transportador associado à membrana citoplasmática, uma porina ligada à membrana externa e uma proteína periplasmática que promove a ligação das proteínas de membrana (NIKAIDO, 1996). As bombas de efluxo mais bem estudadas nesta espécie são MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, os substratos das diferentes bombas de efluxo são específicos para cada sistema, embora já tenha sido observada sobreposição entre eles (LI et al., 1995; POOLE et al., 2004; KOHLER et al., 1997; AIRES et al., 1999).

Em relação à esses sistemas, há autores que descrevem uma relação inversa entre a super-regulação dos genes responsáveis pelo bombeamento de antibióticos e síntese de fatores de virulência, como os ramnolipídios (PEARSON et al., 1999; KÖHLER et al., 2001). De acordo com Pearson et al., (1999), o aumento na atividade de efluxo do sistema MexAB-OprM, responsável pelo bombeamento de drogas e do auto-indutor 3-OC<sub>12</sub>-HSL (3-oxo-dodecanoil – homoserina lactona) para o meio externo, poderia causar diminuição da expressão de genes que estão sob regulação do sistema *las* de quorum-sensing, cuja transcrição é ativada por 3-OC<sub>12</sub>-HSL.

Por outro lado Aendekerk et al., (2002), relatam que mutantes de *P. aeruginosa*, cujos genes responsáveis pelo sistema de efluxo mexGHI-OpmD foram silenciados, apresentaram queda na síntese de fatores relacionados à virulência, como ramnolipídios, piocianina e elastase, além disso, constaram que houve redução na liberação de auto-indutores do tipo acil-homoserina lactonas, os quais estão diretamente relacionados à ativação de genes regulados pelo sistema de quorum-sensing, dentre eles o operon rhlABRI, responsável pela síntese de ramnolipídios

Deve-se considerar a relação entre os processos de resistência a antibióticos e virulência estarem intrinsecamente associados à fisiologia de *P. aeruginosa*. O regulador global Crc é o elemento chave na ligação desses processos. A partir da análise *in silico* do genoma de *P. aeruginosa* PAO1, constatou-se que há 300 genes com possíveis sítios de ligação para Crc, na maioria dos casos, tais genes codificam proteínas de transporte,

envolvidas no metabolismo ou importantes para a resistência a drogas e síntese de fatores de virulências (LINARES et al., 2010).

Schurek et al., (2008) relataram que mutantes com elevada resistência à aminoglicosídeos, apresentam alteração em genes relacionados ao metabolismo energético. A conversão do metabolismo aeróbico para o anaeróbico é uma alternativa para diminuir o acúmulo de aminoglicosídeos no interior da célula, já que o mecanismo pelo qual esses antibióticos atravessam a membrana plasmática é um processo altamente dependente de energia, a qual está disponível em menor quantidade durante essa forma de respiração, com isso diminuindo a assimilação da droga (BRYAN; VAN DEN ELZEN, 1977; SCHUREK et al., 2008). O  $\text{NO}_3^-$  é considerado a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios (VENKATA-RAMANA e KARANTH, 1989; ARINO et al., 1996), de acordo com Manresa et al., (1991) isso se deve ao fato de *P. aeruginosa* utilizar  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de elétrons durante a respiração anaeróbica. Durante a movimentação celular do tipo natação em *P. aeruginosa* foi verificado uma super-expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos e de enzimas de redução de nitrito, a ativação desses genes pode estar associada à produção de ramnolipídios, pois para a ocorrência desse tipo de locomoção é essencial a síntese de biosurfactante para redução da tensão superficial (DÉZIEL et al., 2003).

A associação entre metabolismo energético, resistência a antibióticos e produção de ramnolipídios pode ser feita via Crc (regulador global), pois a síntese de proteínas envolvidas na respiração anaeróbica, utilizando nitrato como aceptor final de elétrons, foi reprimida em *P. aeruginosa* crc mutante (ALVAREZ-ORTEGA; HARWOOD, 2007).

Em relação ao mutante obtido no presente estudo considera-se, a partir dos relatos da literatura, a possibilidade do aumento na produção de ramnolipídios estar associado à elevada resistência desenvolvida por *P. aeruginosa* LBI **2A1** frente às concentrações de antibióticos utilizadas. A presença de uma alta concentração de canamicina e baixas concentrações de cátions divalente, acarretaria em um aumento da capacidade de *P. aeruginosa* LBI **2A1** em sintetizar as proteínas regulatórias PhoP-PhoQ, que por sua vez intensificaria a expressão do operon rhlABRI, responsável pela síntese de ramnolipídios. Outra possibilidade seria aumento da atividade dos sistemas de efluxo e consequente aumento da síntese de ramnolipídios, porém resultados controversos foram descritos em relação a fatores de virulência e bombas de efluxo de drogas. As conexões entre atividades metabólicas, aumento da resistência a antibióticos e síntese de ramnolipídios via respiração

anaeróbica, utilização de nitrato como aceptor final de elétrons e regulador global Crc também podem ser os fatores responsáveis pelo fenótipo observado em *P. aeruginosa* LBI **2A1**, ou seja, elevadas síntese de ramnolipídios e resistência a canamicina.

Entretanto, deve-se considerar que os mecanismos de resistência contra antibióticos utilizados por *P. aeruginosa* é bastante diverso e de acordo com Westbrook-Wadman et al., (1999) para se alcançar alto nível de resistência e ainda manter a viabilidade celular, é necessário a ocorrência de múltiplas mutações no genoma bacteriano, as quais podem não estar relacionadas ao aumento na síntese de ramnolipídios. Além disso, a linhagem *P. aeruginosa* LBI **2A1** pode conter mutações em genes não relacionados à resistência a antibióticos e sim em genes responsáveis pela síntese de proteínas repressoras da rota de biossíntese de ramnolipídios.

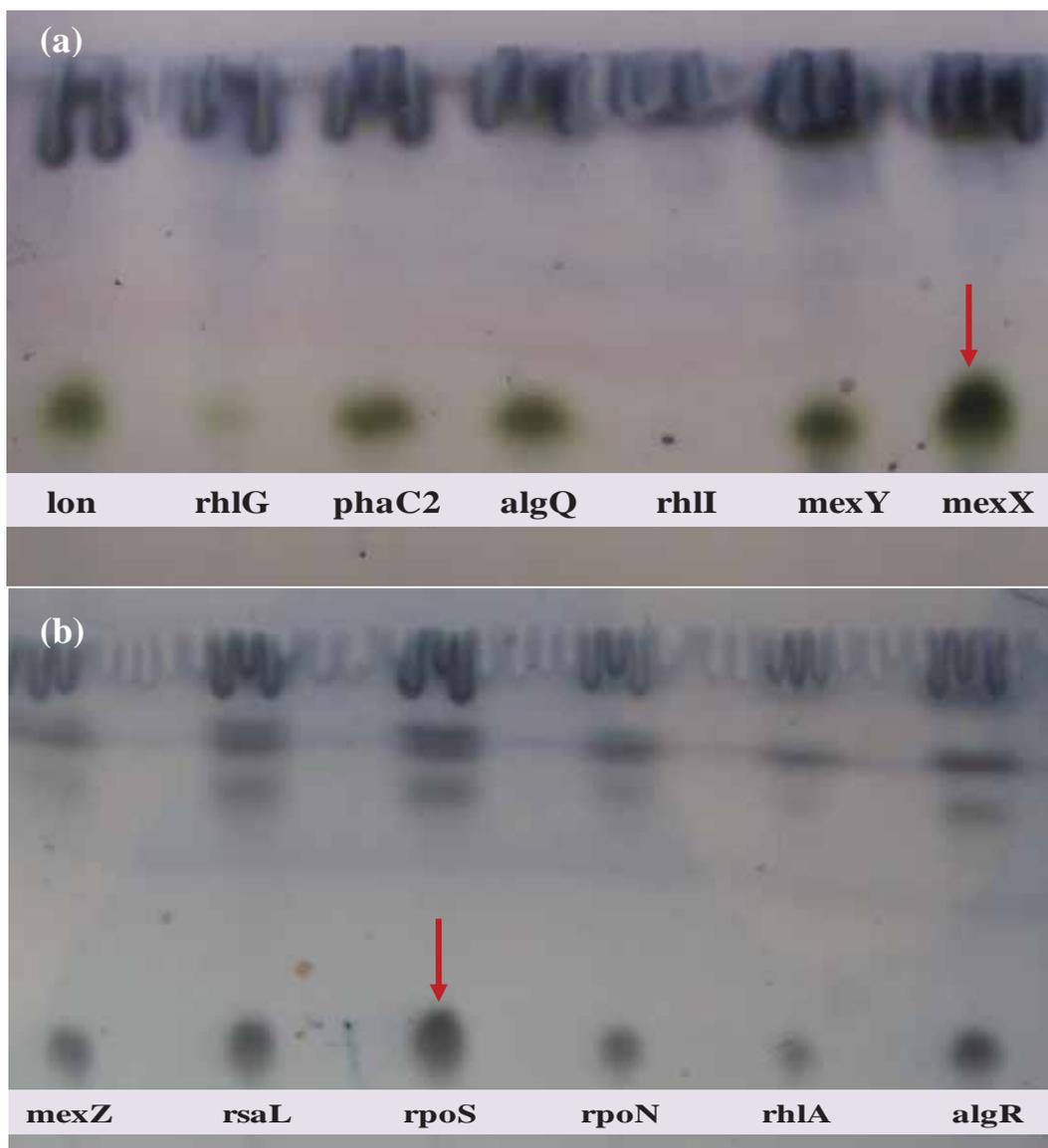
### 5.3.3 Micro-organismos da biblioteca de mutantes da Universidade de Washington

A partir da constatação de que não havia ocorrido a inserção do transposon Tn5 no genoma da bactéria, adquiriu-se quinze mutantes da biblioteca de mutantes da Universidade de Washington (Tabela 5.1), na tentativa de encontrar um micro-organismo com alta produção de ramnolipídios e poder correlacionar com o mutante obtido neste trabalho.

A seleção inicial dos mutantes foi feita em frascos Erlenmeyer e os resultados de produção analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). Os experimentos foram divididos em três grupos de fermentação, no primeiro (**G1**) analisou-se sete mutantes, sendo eles: lon – lon protease, rhlG –  $\beta$ -cetoacil redutase; phaC2 – PHA sintase 2; algQ – proteína regulatória, rhlI – síntese autoindutor – n-acil-homoserina lactona; mexX – bomba de efluxo antimicrobianos e mexY – proteína de membrana – bomba eflux (5.9 a).

No segundo grupo (**G2**) de experimentos foram avaliados seis linhagens - mexZ – proteína regulatória do sistema de efluxo de drogas; rsaL – regulador global; rpoS – fator sigma; rpoN – fator sigma 54; rhlA - ramnosiltransferase e algR - proteína regulatória da síntese de alginato (Fig. 5.9 b).

De acordo com o tamanho e intensidade dos spots os mutantes com maior produção de ramnolipídios, nas condições de cultivo utilizadas, e que, portanto, foram selecionados para compor o terceiro grupo (**G3**) de experimentos são: phaC2, mexX (**G1**) e rpoS (**G2**).



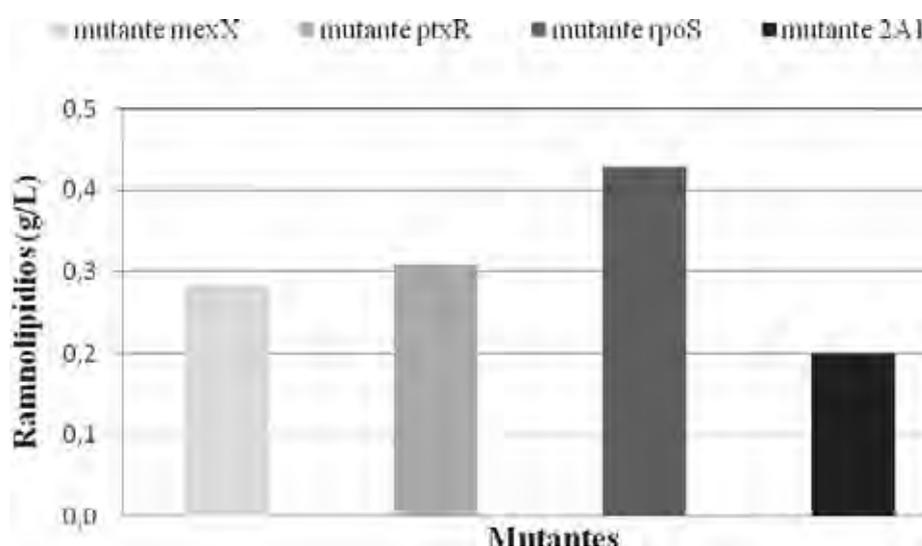
**Figura 5.9** - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de ramnolipídios (a) experimentos do grupo 1 - **G1** (b) experimentos do grupo 2 - **G2**. Os mutantes analisados em cada etapa são descritos nas CCD. As setas indicam os mutantes selecionados para a próxima etapa.

A função do gene *rhIG* na produção de ramnolipídios permanece indefinida, pois Campos-Garcia et al., (1998) descreve que a proteína oriunda deste gene seria responsável pela síntese do precursor lipídico dos ramnolipídios, entretanto Zhu and Rock, (2008) encontraram que a produção de ramnolipídios por mutantes *rhIG* foi semelhante à da linhagem selvagem e propõem um modelo simplificado para a síntese do tensoativo, onde *RhIA* desvia  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP da bioassíntese de ácido graxo (ciclo FASII) para a produção de AHA. É importante verificar que a produção de ramnolipídios no mutante

rhIG utilizado neste trabalho foi baixa quando comparada aos demais, indicando uma possível participação da proteína RhIG na biossíntese desse biossurfactante.

As linhagens selecionadas acima, além do mutante ptxR e *P. aeruginosa* LBI 2A1, foram analisados em conjunto, possibilitando a comparação das concentrações do biossurfactante obtida por cada micro-organismo, a concentração de ramnolipídios foi quantificada em HPLC e os resultados apresentados na Fig. 5.10.

A produção de biossurfactante de *P. aeruginosa* LBI 2A1 (0,2 g/L) foi a menor quando comparada aos demais mutantes avaliados.



**Figura 5.10** – Produção de ramnolipídios (g/L) pelos mutantes phzC2, mexX, ptxR, rpoS e *P. aeruginosa* LBI 2A1, após 72 horas de cultivo em frascos Erlenmeyer à 30°C e 200 rpm, utilizando óleo de girassol como fonte de carbono

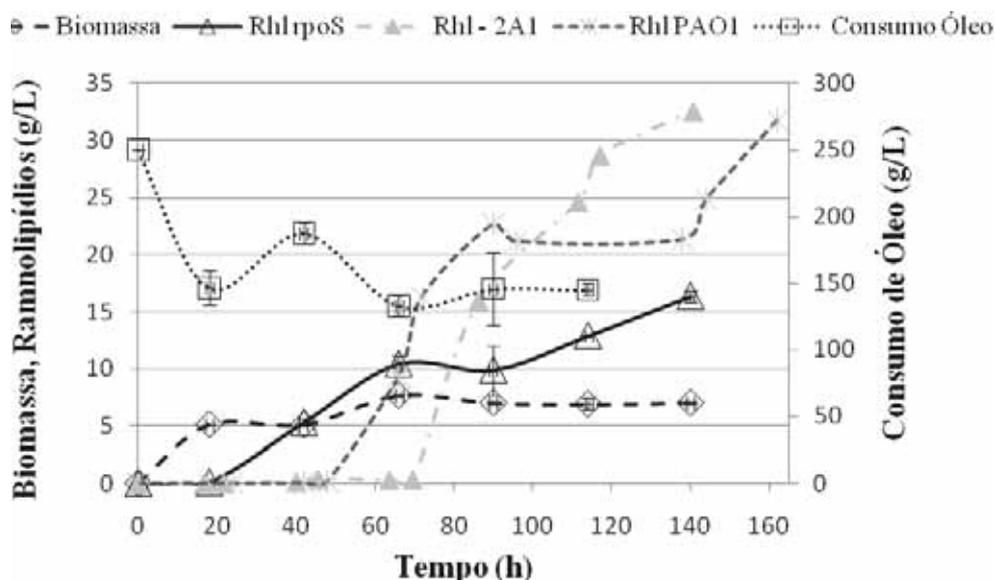
A inativação dos genes mexX, ptxR e rpoS favoreceu a síntese de ramnolipídios e os mutantes, quando comparados à *P. aeruginosa* LBI 2A1, apresentaram aumento na produção de 27,5; 43; 55 e 114%%, respectivamente.

O produto do gene ptxR é um regulador transcricional que modula a produção de fatores de virulência reprimindo a síntese de PQS. Com a inativação de ptxR não haveria repressão da síntese de PQS e a produção de ramnolipídios seria favorecida, já que, de acordo com Diggle et al., 2003, PQS ativa diretamente o sistema de quorum sensing *rhIRI*. Carty et al., (2006) relata aumento da produção dos autoindutores C<sub>4</sub>-HSL e 3-O-C<sub>12</sub>-HSL e ramnolipídios em mutantes ptxR, quando comparados à linhagem selvagem.

A última etapa dos experimentos foi feita em biorreator com o mutante rpoS, para que pudéssemos comprovar o aumento da produção de biossurfactante em relação ao mutante obtido neste estudo (Fig. 5.11).

A concentração final de ramnolipídios obtida pelo mutante rpoS foi de  $16,3 \pm 0,5$  g/L, ou seja, inferior à alcançada por *P. aeruginosa* LBI **2A1**, que foi de  $32,6 \pm 2,3$  g/L, todavia, deve-se considerar que durante o experimento realizado com o mutante rpoS, houve perda de aproximadamente 2,0L de caldo devido a intensa formação de espuma, o que aconteceu entre 55 e 63 horas de fermentação. O volume perdido corresponde a 40% do volume total de meio presente no início do processo, além disso, houve perda de células e do próprio ramnolipídio que havia sido produzido.

Entretanto, uma informação importante pode ser retirada desses resultados, o período de indução para o início da síntese de ramnolipídios é bem menor no mutante rpoS, o qual inicia a produção a partir de 18 horas, enquanto a linhagem **2A1** e **PAO1** somente após 50 e 70 horas de fermentação, respectivamente.



**Figura 5.11** - Crescimento celular (g/L), produção de ramnolipídios (g/L) e consumo de óleo do mutante rpoS. A curva em cinza refere-se à produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI **2A1**. Experimentos realizados em bioreator Infors – 13L.

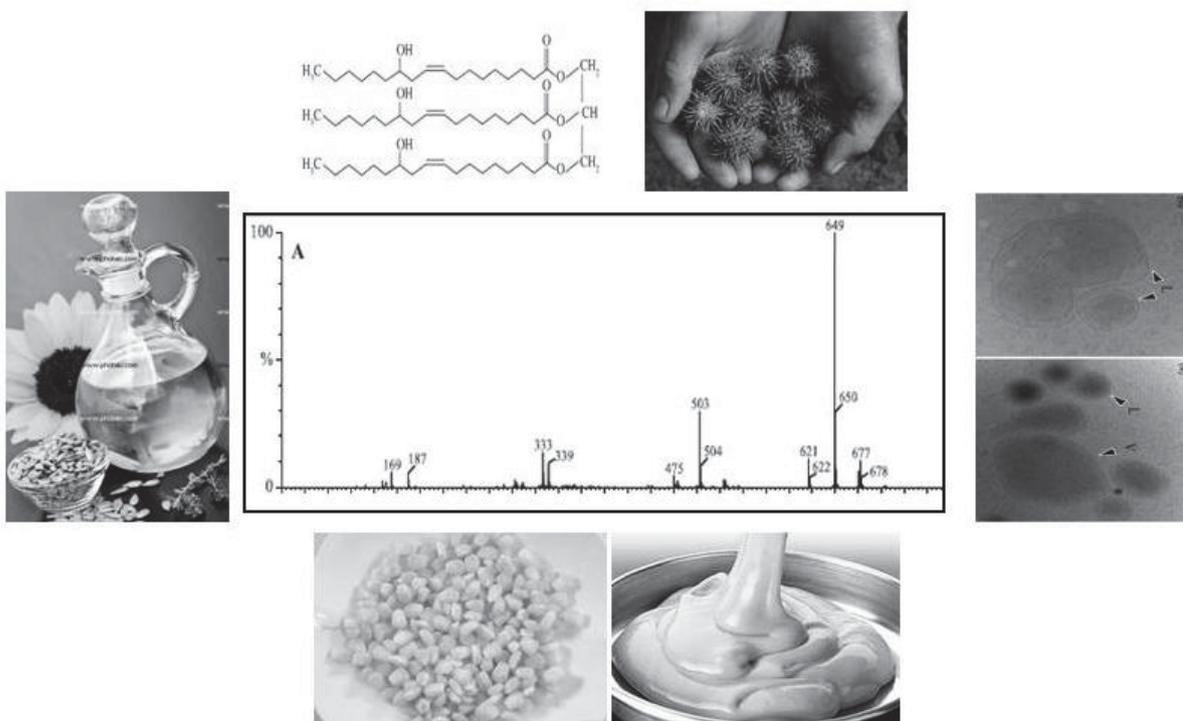
Uma extensa revisão acerca da regulação genética da produção de ramnolipídios foi realizada por Reis et al., 2011, onde foi descrita a relação do fator sigma rpoS com a síntese desse tensoativo por *P. aeruginosa*. O fator sigma rpoS tem maior nível de expressão no início da fase estacionária de crescimento e em condições limitantes de

nutrientes (BERTANI et al., 2003). Sua função está associada à resposta a condições de estresse em *P. aeruginosa*, além de estar envolvido na modulação dos reguladores transcricionais RhlR e LasR (LATIFI et al., 1996).

O operon rhlAB está sob regulação do fator sigma rpoS, portanto a independência do mutante em relação à expressão desse fator, pode ter diminuído o período de indução, permitindo que a síntese de ramnolipídios se iniciasse 52 horas antes, quando comparado ao início da produção por *P. aeruginosa* LBI **2A1**. Por outro lado, é possível que a concentração de ramnolipídios tenha sido menor, justamente pela falta desse fator, já que, o operon rhlAB é super-regulado pelo fator sigma rpoS (MEDINA et al., 2003).

## 6. CAPÍTULO IV

### PROPRIEDADES DE SOLUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE HOMÓLOGOS



## 6.1 INTRODUÇÃO

Os ramnolipídios produzidos por linhagens de *P. aeruginosa* estão entre os mais bem estudados biossurfactantes, eles são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores próximos à 30 mN/m (PARRA et al., 1989) e a concentração micelar crítica (CMC) desses compostos pode variar de 5 a 200 mg/L, sendo esta variação dependente da proporção dos diferentes homólogos presentes na mistura e (ABALOS et al., 2001; BENINCASA et al., 2004). Essa classe de tensoativo é capaz de manter sua atividade de superfície e emulsificação mesmo sob condições extremas de temperatura e pH (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2009; LOVAGLIO et al., 2011).

De acordo com Vinson et al (1989), os biossurfactantes são capazes de formar microestruturas como micelas, vesículas e bicamadas, entre outros fatores, a morfologia desses agregados é afetada pela concentração de surfactante (SÁNCHEZ et al., 2007), pH (CHAMPION et al., 1995), força iônica (MATA et al., 2004) e co-solutos ou contaminantes como alcoóis e metais (CHAMPION et al., 1995, VILLENEUVE et al., 1998).

As aplicações e benefícios dos ramnolipídios são diversos, pois apresentam grande potencial na descontaminação de águas e solos poluídos por petróleo e metais pesados (MULLIGAN, 2005), além disso, podem ser utilizados como emulsificantes e solubilizantes em indústrias de processamento de alimentos, cosméticos e fármacos. Entre os diferentes processos industriais e mesmo em aplicações ambientais, onde os biossurfactantes podem ser utilizados, há grande variação de pH, pressão, temperatura, bem como a adição de aditivos como o etanol e NaCl. Para que os ramnolipídios possam substituir os surfactantes químicos em tais aplicações, é importante que mantenham sua atividade de superfície, agregação e emulsificação nas condições descritas acima.

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* foram descritos por Lang e Wagner, (1987) como uma mistura de espécies homólogas RL1 – Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>; RL2 - RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>, RL3 - Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub> e RL4 - RhaC<sub>10</sub>; atualmente são descritos cerca de 60 homólogos de ramnolipídios produzidos por espécies de *Pseudomonas* e bactéria de outras famílias (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). As propriedades desse biossurfactantes dependem da composição e distribuição de homólogos, que por sua vez são determinadas

pela linhagem bacteriana, condições de cultivo e composição do meio de cultura (GUERRA-SANTOS et al., 1984).

A identificação dos homólogos produzidos é de suma importância para a caracterização das propriedades exibidas pelas soluções de ramnolipídios, bem como, para a investigação das aplicações individuais de cada homólogo. O objetivo desta última etapa foi avaliar o efeito da adição de NaCl e etanol nas soluções do tensoativo, bem como a ação sinérgica dos aditivos e da variação de pH nas propriedades de solução dos ramnolipídios. Além disso, foram feitas análises por espectrometria de massas, dos ácidos graxos e homólogos de ramnolipídios produzidos a partir de diferentes fontes de carbono.

## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Propriedades da Solução de Ramnolipídios**

#### **6.2.1.1 Preparo da Solução de Ramnolipídios**

O ramnolipídio utilizado no preparo das soluções foi extraído de acordo com o protocolo descrito no item 6.2.2.2. As soluções foram preparadas em água ultra pura nas seguintes concentrações: 1,0; 10; 20; 30; 40; 50; 100, 250, 500 e 1000 mg/L. Analisou-se a influência do pH, variando de 4 – 8; e de aditivos como NaCl (0,4 e 0,8M) e C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (0,3; 0,5 E 0,7M). Para ajuste do pH utilizou-se HCl (0,1M) e NaOH (0,1M). A homogeneização das amostras foi feita em vórtex. Todas as leituras foram realizadas com as soluções em temperatura ambiente. O controle corresponde à solução de ramnolipídios em água ultra-pura, sem a presença de aditivos ou ajuste de pH. Para avaliar o efeito sinérgico entre os aditivos e alteração de pH, utilizou-se como controle as soluções com pH ajustado e sem a presença de aditivos e aquelas com aditivo, porém sem controle de pH.

#### **6.2.1.2 Atividade de emulsificação (E<sub>24</sub>)**

Os testes de emulsificação foram realizados com as soluções descritas no item 6.2.1.1. Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 2 mL de querosene e 2 ml da solução de ramnolipídios a ser avaliada, a mistura foi agitada vigorosamente por 2 minutos. Os tubos foram mantidos em repouso e as medidas das emulsões foram feitas após 24 horas. A atividade de emulsificação (E<sub>24</sub>) foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$E_{24} = \frac{AE}{AT} \times 100$$

Onde: AE = altura da emulsão e AT = altura total da mistura. Todos os testes foram conduzidos em triplicata.

### **6.2.1.3 Métodos Analíticos**

#### **6.2.1.2.1 Tensão Superficial**

As medidas de tensão superficial das soluções de ramnolipídios foram feitas a 25°C, segundo o método do anel de De Nöuy utilizando-se um tensiômetro Krüss K6. As medidas foram feitas em triplicata.

#### **6.2.1.2.2 Turbidez**

As medidas de turbidez das soluções de ramnolipídios foram feitas em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu) à 600 nm, a temperatura ambiente. As leituras foram feitas em triplicata.

### **6.2.2 Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios por Espectrometria de Massas**

Para a análise dos homólogos em espectrômetro de massas, produziu-se ramnolipídios utilizando borra de óleo de milho, óleo de girassol e óleo de mamona como fontes de carbono. As amostras utilizadas para análise correspondem ao tempo final de fermentação (140 horas).

#### **6.2.2.1 Produção de Ramnolipídios**

As fermentações para síntese a partir de borra de óleo de milho e óleo de girassol foram feitas em biorreator, como descrito no Capítulo III, já a obtenção de ramnolipídios utilizando óleo de mamona como fonte de carbono, foi feita em frascos de Erlenmeyer (vide Capítulo II). O micro-organismo utilizado foi *P. aeruginosa* LBI **2A1**.

### 6.2.2.2 Extração de Ramnolipídios

Um volume do caldo livre de células foi misturado ao mesmo volume de n-hexano (1:1), agitou-se vigorosamente até completa homogeneização. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso, até que houvesse a separação das fases. Descartou-se a fase contendo n-hexano/ óleo e adicionou-se  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% 1:100 (v/v) à fase aquosa, levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do tensoativo utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em rotavapor e obtenção do ramnolipídio. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

### 6.2.2.3 Preparo das amostras

O ramnolipídio (Rhl) proveniente de cada fonte de carbono foi extraído e dissolvido em metanol. A concentração inicial foi 10g/L para as soluções de Rhl de óleo de girassol ( $\text{Rhl}_{\text{OG}}$ ) e de borra de óleo de milho ( $\text{Rhl}_{\text{BOM}}$ ) e 4 g/L para a solução de Rhl de óleo de mamona ( $\text{Rhl}_{\text{OM}}$ ).

### 6.2.2.4 Espectrometria de Massas – ESI-MS e ESI-MS/MS

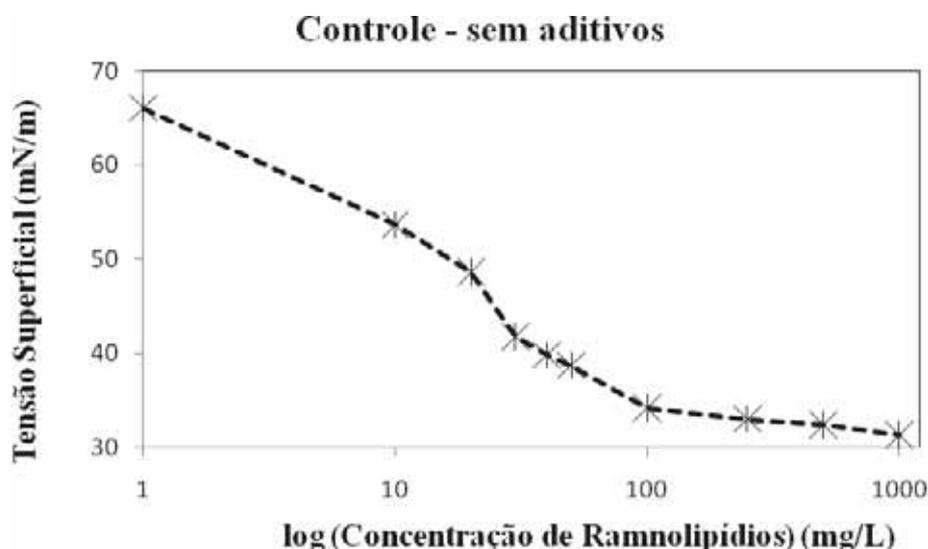
As caracterizações foram feitas em um espectrômetro de massas utilizando Ionização por Eletrospray (ESI -*Electrospray ionization*) acoplada a um analisador de massas do tipo Quadrupolo-Tempo de Vôo (Q-ToF - *Quadrupole Time-of-Flight*) (Micromass, Manchester, UK). O equipamento foi calibrado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , as amostras foram diluídas individualmente em uma solução de metanol/água (1:1) + 0,1% de hidróxido de amônio, para que houvesse a desprotonação das moléculas de ramnolipídios, e injetadas diretamente na fonte de ionização ESI através de uma bomba-seringa com fluxo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Os espectros foram adquiridos em modo negativo em uma faixa de massas de 100 a 1.500  $m/z$ . As condições de operação utilizadas foram: voltagem do capilar: 3,5 kV; voltagem do cone: 35 V; voltagem do cone extrator: 4 V; temperatura de dessolvatação: 100°C; temperatura da fonte: 100 °C. Para os experimentos de MS/MS o gás utilizado foi Argônio e a energia de colisão: 25eV.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 Propriedades da Solução de Ramnolipídios – Efeito de aditivos

#### 6.3.1.1 Solução sem aditivos - controle

A tensão superficial da água ultra-pura foi reduzida com o aumento da concentração de ramnolipídios. Observa-se um ponto de transição em 30 mg/L e outro em 100mg/L, acima dessas concentrações a intensidade da redução das medidas foi menor, sendo que acima de 100 mg/L houve tendência à estabilização das mesmas (Fig. 6.1).



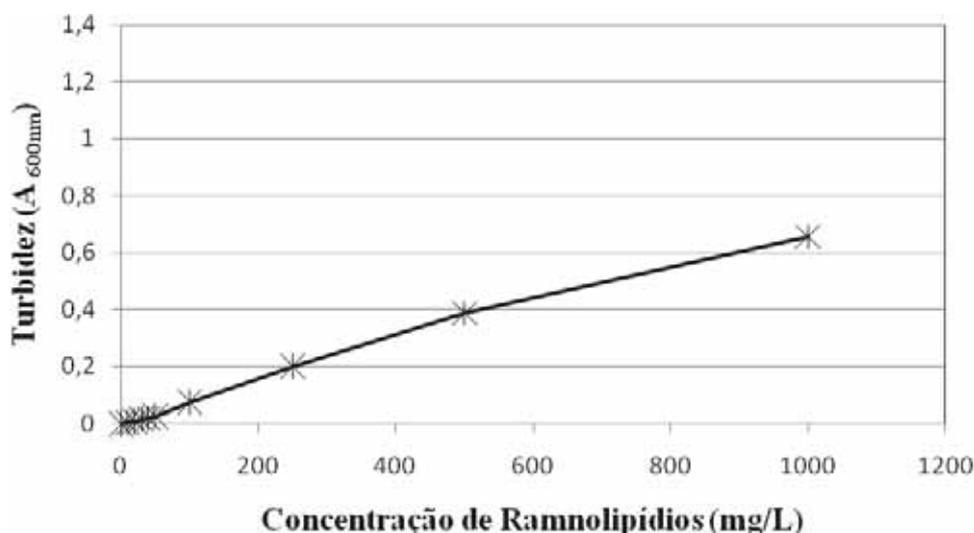
**Figura 6.1** – Tensão Superficial (mN/m) de soluções com diferentes concentrações de ramnolipídios (1 – 1000 mg/L).

Este perfil da curva de tensão superficial versus concentração de ramnolipídios vem sendo descrito na literatura. Pornsunthorntawe et al., (2009) encontraram duas zonas de transição, uma em 40 mg/L, a qual foi associada à formação de micelas de mono-ramnolipídios e outra em 200 mg/L, que foi considerada a concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante utilizado pelos autores. Já Cohen e Exerowa (2007) relatam a presença de três pontos de transição e os relaciona ao início da formação de agregados, à formação de micelas de mono-ramnolipídios e à CMC da mistura de ramnolipídios utilizada nos experimentos.

A variação no número de zonas de transição deve-se à presença de homólogos em diferentes proporções e com variado grau de hidrofobicidade, levando à formação de micelas em diferentes concentrações (COHEN e EXEROWA, 2007; HAN et al., 2004).

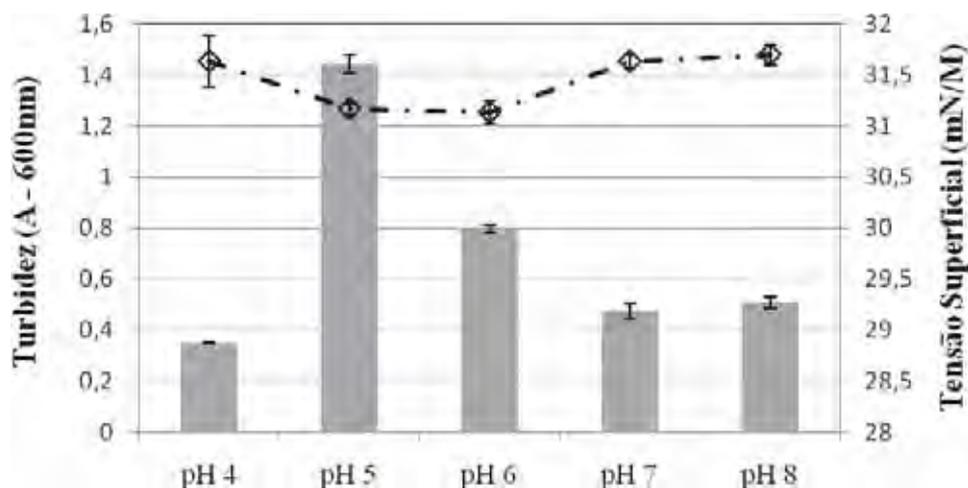
No presente estudo houve uma redução gradual da tensão superficial quando a concentração de ramnolipídios variou de 1 para 20 mg/L, o que justifica-se pelo aumento do número de monômeros que se dispõem na superfície da solução, alterando a atividade superficial da mesma; entre 20 e 30 mg/L há uma alta concentração de monômeros livres que se organizam na interface ar/ líquido diminuindo a tensão superficial com mais intensidade, já acima de 30 mg/L, reduz-se a queda porque inicia-se a formação de agregados, o que diminui a disponibilidade de monômeros livres. A CMC da mistura de ramnolipídios seria aproximadamente 100 mg/L, por isso observa-se uma tendência à estabilização das medidas acima desta concentração.

A descrição de uma relação entre turbidez e formação de micelas e agregados em soluções de ramnolipídios vem sendo feita por alguns autores (SÁNCHEZ et al., 2007; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2009), por isso, para avaliar o aumento do número e tamanho dos agregados de ramnolipídios em função do aumento de sua concentração foram feitas medidas de turbidez da solução controle (Fig 6.2).



desse biossurfactante, como indicado pelas medidas de tensão superficial. A absorção máxima foi de 0,65 com a solução de 1,0 g/L e a inclinação da reta indica uma tendência à estabilização dos valores de turbidez.

Em seguida realizou-se medidas de tensão superficial e turbidez das soluções de ramnolipídios 1,0 g/L com pH ajustado entre os valores 4,0 e 8,0 (Fig. 6.3).



**Figura 6.3** - Medidas de turbidez e tensão superficial da solução de ramnolipídios 1,0 g/L com variação de pH de 4,0 à 9,0.

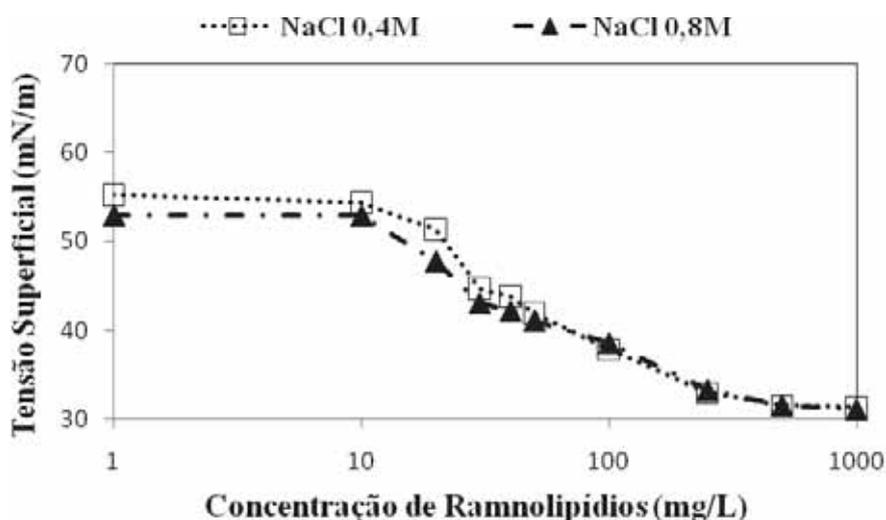
O controle de pH não causou alterações na tensão superficial das soluções, já que a maior diferença entre as medidas foi de 0,3 mN/m. Em relação à turbidez, há maior influência dos íons hidrogênio no comportamento de agregação dos ramnolipídios. Quando comparado à solução sem ajuste de pH observa-se que a absorção das soluções com pH 4, 7 e 8 diminuiu, entretanto houve um aumento significativo da turbidez das soluções com pH 5 e 6, coincidindo com a pequena redução de tensão nessa faixa de pH. De acordo com Ishigami et al., (1993) o pKa dos ramnolipídios é 5,6, portanto entre os valores de pH 5 e 6 encontram-se em solução monômeros protonados e desprotonados, facilitando a interação entre os mesmos, já que não há repulsão eletrostática entre as moléculas do tensoativo, o que conseqüentemente favorece a formação dos agregados de ramnolipídios.

### 6.3.1.2 Efeito da adição de NaCl às soluções de Ramnolipídios

Verificou-se o efeito da adição de 0,4 e 0,8M de NaCl na atividade de superfície das soluções de ramnolipídios (Fig. 6.4).

Ao comparar os resultados com aqueles obtidos para a solução controle, observa-se que com a adição de sal, independente da concentração, não há alteração na atividade de superfície entre as concentrações de 1 e 10 mg/L de ramnolipídios, além disso, o valor da tensão para a solução com 1 mg/L de biossurfactante é inferior ao do controle. As zonas de transição observadas anteriormente (Fig. 6.1) se mantêm nas curvas referente à cada concentração de NaCl utilizada.

O efeito da adição de sal diminui com o aumento da concentração de ramnolipídios, no início verifica-se que a tensão é menor na solução com maior quantidade de NaCl, porém este efeito se dilui e acima de 200 mg/L de ramnolipídios não há diferença entre os valores de tensão superficial das soluções analisadas.

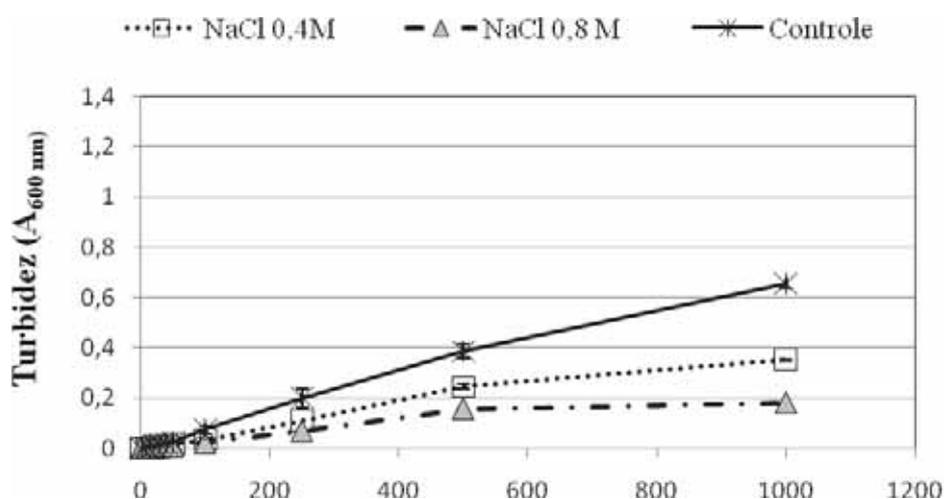


**Figura 6.4** – Efeito da adição de NaCl na tensão superficial (mN/m) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.

Helvaci et al., (2004) relata que a adição de NaCl causou redução da tensão superficial de soluções de ramnolipídios devido à interação dos eletrólitos com os grupos carboxílicos do tensoativo, causando diminuição da repulsão entre os monômeros de ramnolipídios e conseqüente empacotamento dos mesmos, aumentando sua atividade de superfície.

A tensão superficial mínima das soluções de ramnolipídios contendo NaCl não foi alterada, evidenciando que o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBI 2A1, em óleo de girassol, é tolerante ao aumento da força iônica, pois mantém sua atividade de superfície, característica que o torna adequado para ser empregado em processos de biorremediação da água do mar e regiões costeiras.

O comportamento de agregação dos ramnolipídios, através de medidas de turbidez, também foi avaliado na presença de NaCl (Fig. 6.5).

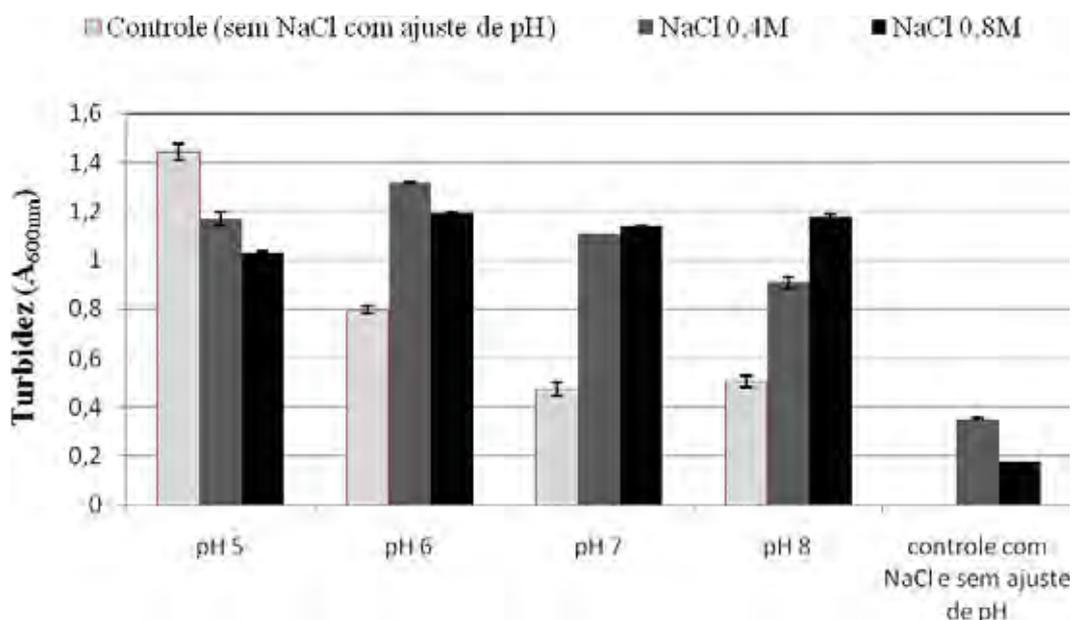


**Figura 6.5** – Efeito da adição de NaCl na turbidez ( $A_{600nm}$ ) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.

Com a adição de NaCl às soluções de biossurfactante houve queda nas medidas de turbidez quando comparado ao controle. O aumento da concentração de sal de 0,4 para 0,8M reduziu ainda mais o número e tamanho dos agregados do tensoativo. Foram feitos testes de emulsificação com estas soluções de ramnolipídios contendo sal e querosene como fonte hidrofóbica e após 24 horas não havia emulsão entre as fases, entretanto sua capacidade de redução da tensão superficial foi mantida na presença de NaCl, como citado anteriormente e ainda, de acordo com Lovaglio et al., (2011) o emprego de uma pequena concentração de NaCl ( $10^{-3}$  M) em soluções de ramnolipídios foi benéfico para a emulsificação de benzeno, querosene e óleo de soja .

Em seguida avaliou-se o efeito do controle de  $pH_{(5-9)}$ , na turbidez das soluções de ramnolipídios (1g/L) contendo 0,4 e 0,8M de sal. Como controle utilizou-se os seguintes grupos: **1.** solução sem NaCl e com variação de pH e **2.** Solução com NaCl e sem ajuste de pH (Fig. 6.6).

O ajuste do pH favoreceu a formação de agregados de ramnolipídios nestas soluções, pois houve um aumento significativo nas medidas de turbidez em toda amplitude de pH avaliada. Quando comparado à solução controle (sem sal com ajuste de pH), verifica-se que a adição de NaCl favoreceu o aumento do número e tamanho de agregados formados nas soluções com pH 6, 7 e 8.



**Figura 6.6** – Efeito da variação do pH na turbidez das soluções de ramnolipídios (1g/L) contendo NaCl (0,1; 0,4 e 0,8M) como aditivo.

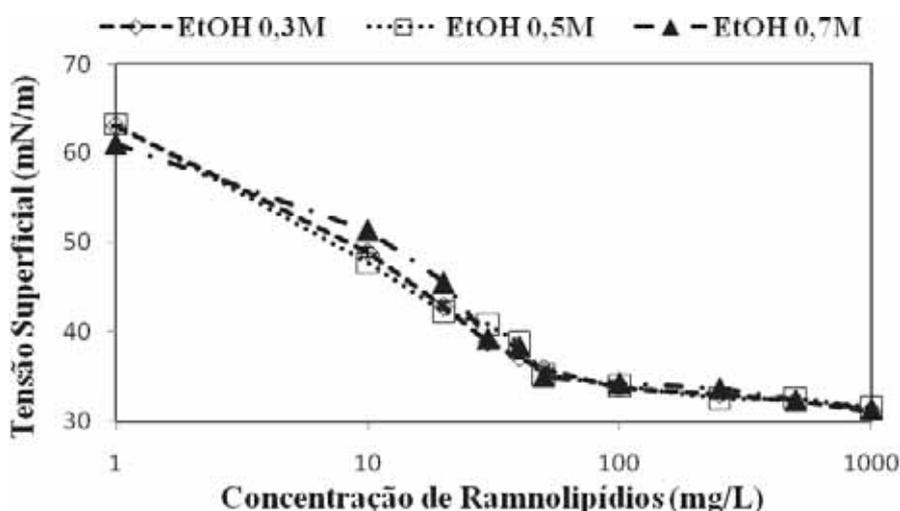
Observa-se que há uma mudança gradual na relação entre concentração de NaCl e pH. Na faixa onde há maior concentração de íons hidrogênio (pH 5 e 6) o aumento da concentração de sal provoca uma pequena redução na absorção da solução; em pH neutro o comportamento de agregação é semelhante nas duas molaridades de sal, já em pH básico há uma inversão das relações citadas acima. O aumento da concentração de OH<sup>-</sup> na solução aumenta a desprotonação das moléculas de ramnolipídios, facilitando a ligação dos íons Na<sup>+</sup>, a neutralização dos monômeros anula a repulsão eletrostática e consequentemente favorece a formação de agregados em maiores concentrações de NaCl.

Foram realizados testes de emulsificação com as soluções contendo sal e pH ajustado, e após 24 horas não foi detectado emulsão entre as fases. O controle de pH favoreceu o aumento do número e tamanho dos agregados de ramnolipídios nas soluções com NaCl, porém, não exerceu o mesmo efeito positivo na atividade de emulsificação.

### 6.3.1.3 Efeito da adição de Etanol ( $C_2H_5OH$ ) às soluções de Ramnolipídios

O segundo aditivo a ser avaliado é o etanol (EtOH), que foi adicionado nas concentrações de 0,3; 0,5 e 0,7M. O efeito desse álcool na atividade de superfície dos ramnolipídios pode ser visualizado na Fig. 6.7.

As curvas de tensão superficial das soluções contendo etanol foram muito semelhantes entre si. Novamente existe um ponto de transição em 30 mg/L, que corresponde ao início da agregação dos monômeros de ramnolipídios, já a CMC dessas soluções foram reduzidas quando comparadas à solução controle pois, observa-se a estabilização das medidas em concentrações abaixo à 100 mg/L.



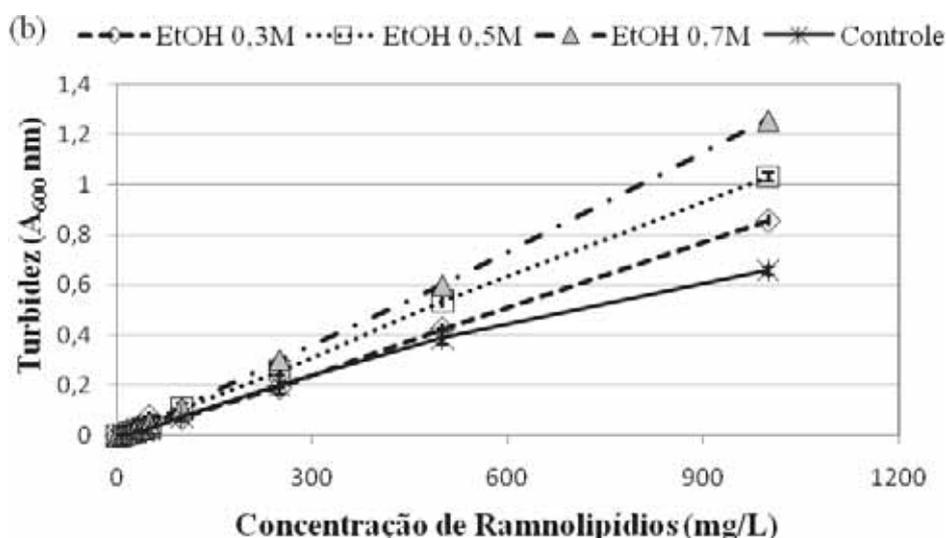
**Figura 6.7** – Efeito da adição de  $C_2H_5OH$  na tensão superficial (mN/m) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.

Os produtos com finalidades cosméticas e de limpeza normalmente contêm álcool em sua formulação e os ramnolipídios podem ser incorporados a estes como agentes emulsificantes, daí a importância desse biossurfactante se manter ativo na presença do etanol.

De acordo com Pornsunthorntawee et al., (2009), a adição de concentrações crescentes de etanol causou aumento na CMC da solução de ramnolipídios produzido por *P. aeruginosa* SP4, as soluções analisadas por eles foram preparadas em tampão fosfato pH 7,4, nestas condições as moléculas de ramnolipídios encontram-se desprotonadas e portanto mais susceptíveis à reação com aditivos. No presente estudo as medidas de tensão superficial foram obtidas a partir de soluções de ramnolipídios elaboradas com água ultra-pura e o pH após a adição do etanol e NaCl era  $4,30 \pm 0,04$  e  $4,0 \pm 0,5$ , respectivamente,

nestas concentrações de íons hidrogênio os ramnolipídios encontram-se protonados e portanto, menos reativos.

A adição de quantidades crescentes de etanol causou aumento nas medidas de turbidez da solução de ramnolipídios, portanto o álcool favorece a agregação dos monômeros do tensoativo (Fig. 6.8). Este resultado reforça àqueles obtidos com as medidas de tensão superficial, que indicaram redução da CMC da solução de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 quando comparado ao controle.



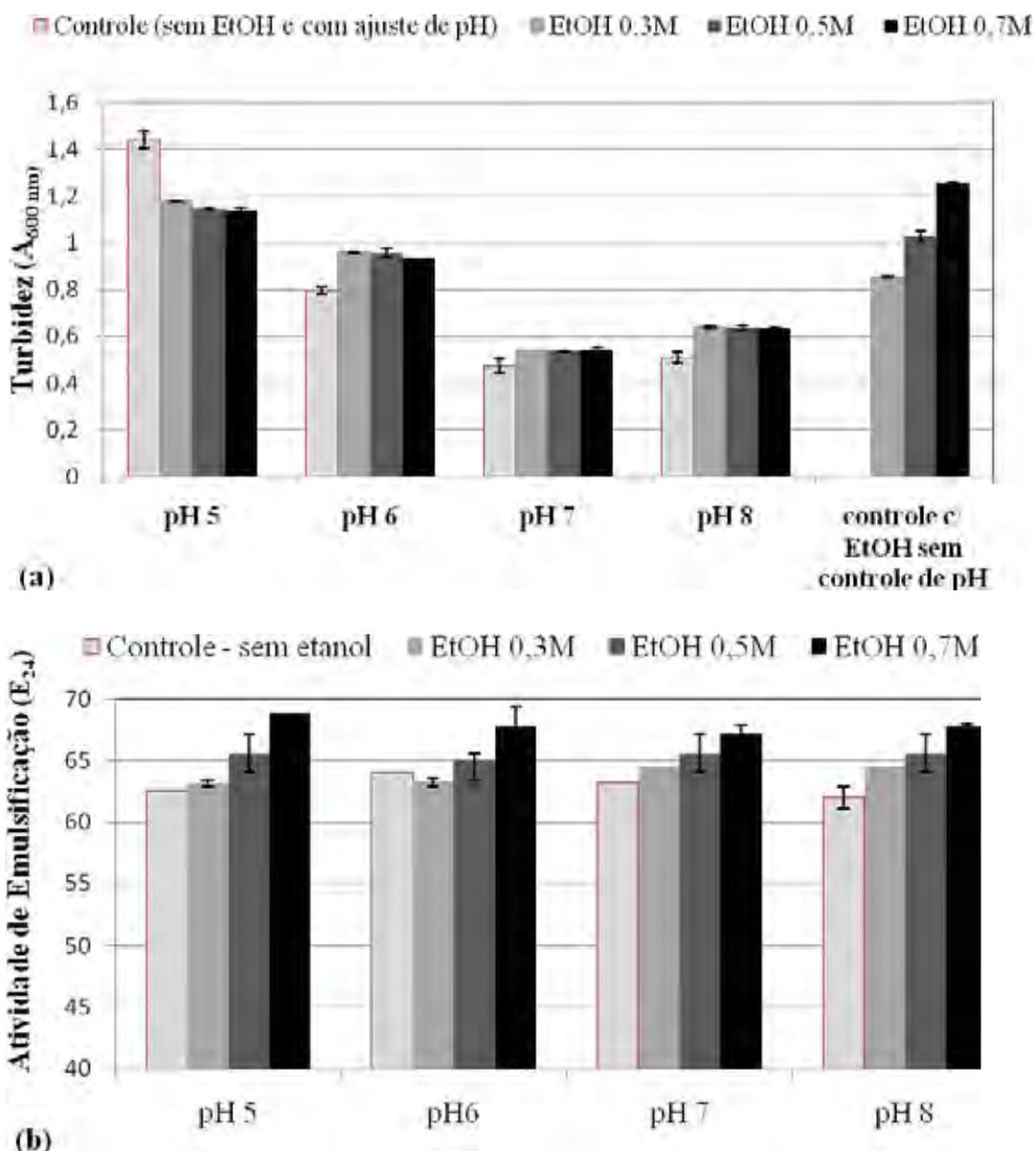
**Figura 6.8** – Efeito da adição de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  na turbidez ( $A_{600\text{nm}}$ ) de soluções de ramnolipídios com concentrações de 1 a 1000 mg/L.

A fim de verificar se a interação entre álcool e pH exerce algum efeito na formação de agregados de ramnolipídios, foram feitas medidas de turbidez das soluções controle (1. sem aditivo/ com ajuste de pH e 2. com aditivo/ sem ajuste de pH) e daquelas contendo  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  com pH ajustado (Fig. 6.9a).

Nas soluções com pH controlado, não há diferença significativa entre as medidas de turbidez das soluções com diferentes concentrações de etanol, entretanto observa-se um decréscimo na absorção à medida que diminui a concentração de íons hidrogênio, tanto para a solução controle 1 como para aquelas com etanol e pH ajustado. Estes resultados podem ser relacionados ao obtidos por Pornsunthorntawe et al., (2009), que relataram uma redução nos agregados com a adição de etanol em pH 7,4, os resultados apresentados acima (Fig. 6.8) indicaram aumento do comportamento de agregação com adição do álcool, porém o pH dessas soluções era de  $4,30 \pm 0,04$ , evidenciando a influência dos íons hidrogênio nas propriedades de solução dos ramnolipídios.

A variação de pH exerce influência nas estruturas formadas pelos monômeros de ramnolipídios em concentrações acima da CMC. Foram observadas mudança na morfologia dos agregados de ramnolipídios de lamelar para vesicular e micelar com o aumento do pH de 5,8 para 8 (CHAMPION et al., 1995).

As soluções de ramnolipídios com etanol e sem ajuste de pH foram avaliadas quanto ao seu poder de emulsificação do querosene, entretanto após 24 horas não havia emulsão entre as fases hidrofílica e hidrofóbica. Uma alternativa encontrada foi ajustar o pH das soluções e verificar se favoreceria a atividade de emulsificação na presença de etanol (Fig. 6.9b).



**Figura 6.9** – Efeito da variação do pH na turbidez (a) e na atividade de emulsificação (b) das soluções de ramnolipídios (1g/L) contendo etanol (0,3; 0,3 e 0,3M) como aditivo.

Ao controlar o pH das soluções contendo etanol, foi possível quantificar a atividade de emulsificação ( $E_{24}$ ) em toda a amplitude de pH e concentrações de  $C_2H_5OH$  avaliadas e as soluções com 0,7M de etanol apresentaram os maiores índices de emulsificação, entretanto não houve diferença significativa na formação de emulsão nos diferentes valores de pH avaliado.

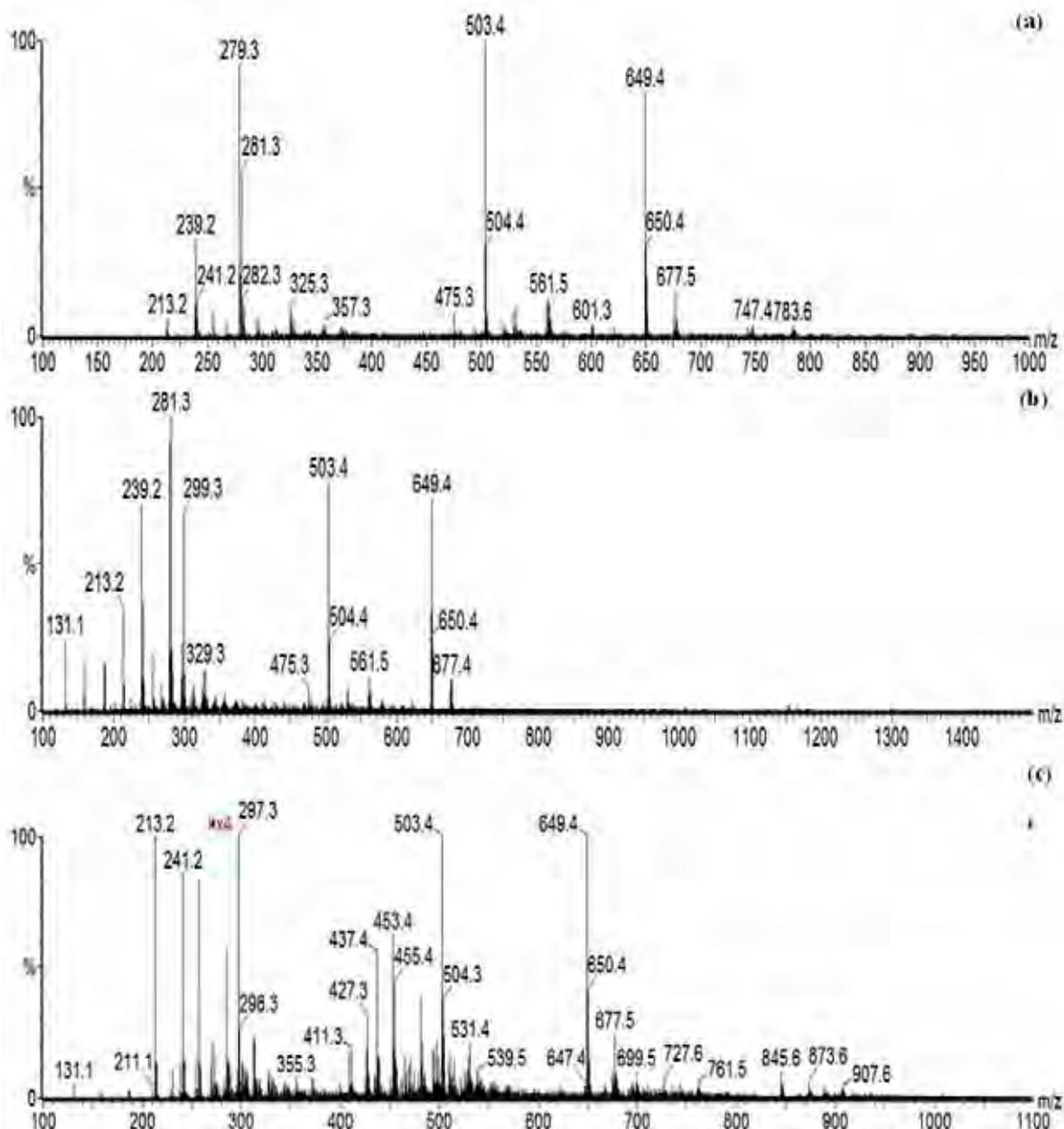
A adição de etanol às soluções de ramnolipídios com pH 7,4, aumentou a eficiência de encapsulação do corante hidrofóbico Sudam III. O álcool pode agir como um co-surfactante e interagir com as moléculas de ramnolipídios através ligação de hidrogênio, levando à formação de agregados compostos por ramnolipídio-etanol, que aumentaram a solubilidade do corante apolar (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2009).

Estes resultados mostram que a adição de etanol em soluções de ramnolipídios não causa alterações em sua atividade de superfície e favorecem o aumento do número e tamanho dos agregados formados. A atividade de emulsificação é aumentada na presença do álcool nas concentrações de 0,3, 0,5 e 0,7M, quando o pH das soluções é ajustado para 5, 6, 7 ou 8.

### **6.3.2 Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1**

As análises por ESI(-) - MS forneceram a composição dos homólogos produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1. A Figura 6.10 mostra os íons obtidos das amostras de ramnolipídios produzidos a partir de óleo de girassol (Fig. 6.10a - m/z 213, 239, 279, 281, 325, 475, 503, 649 e 677), borra de óleo de milho (Fig. 6.10b m/z 131, 213, 239, 279, 281, 299, 329, 475, 503, 649 e 677) ou óleo de mamona (Fig. 6.10c m/z 131, 213, 239, 241, 257, 297, 409, 411, 427, 437, 453, 481, 503 e 649). Observa-se que há diferença na composição e proporção de homólogos oriundos das diferentes fontes de carbono utilizadas.

De acordo com Catharino et al., (2007) os íons m/z 279 e m/z 281 correspondem ao ácido linoléico e oléico, respectivamente, que são os ácidos graxos presentes em maior concentração tanto na borra de óleo de milho como no óleo de girassol (GUPTA, 2002), portanto estes não são ácidos graxos produzidos pela linhagem estudada e sim resíduos das fontes de carbono utilizadas para produção de ramnolipídios, o que é reforçado pela ausência de tais íons no espectro correspondente aos homólogos produzidos a partir do óleo de mamona.



**Figura 6.10** – ESI (-) – MS de amostras de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 a partir de diferentes fontes de carbono (a) óleo de girassol (b) borra de óleo de milho (c) óleo de mamona

Os  $\beta$ -hidroxiácidos, livres ou associados, produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 a partir das três fontes de carbono estão descritos na Tabela 6.1. Observa-se que há diferença na composição e proporção dos ácidos graxos presente nas amostras oriundas de cada fonte de carbono avaliada.

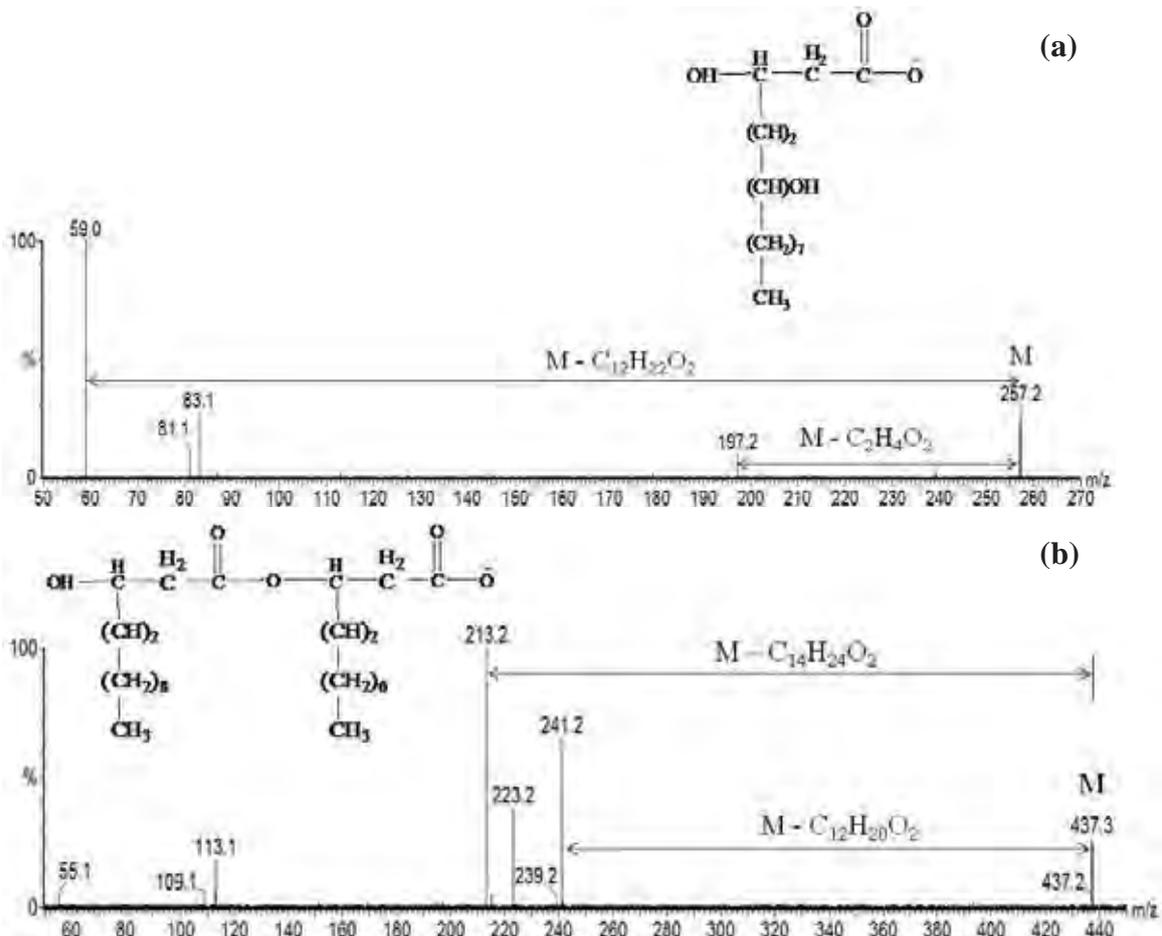
**Tabela 6.1** – Composição química e abundância relativa de ácidos graxos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (O.G – óleo de girassol; B.O.M – borra de óleo de milho, O.M – óleo de mamona)

| Composição Elementar<br>Estrutura/ Insaturações                                 | Nomenclatura /<br>[M-H] <sup>-</sup> Fragmentações m/z | Abundância<br>Relativa (%) |       |      |
|---|--|----------------------------|-------|------|
|   |  | O.G                        | B.O.M | O.M  |
| C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> /C <sub>12:1</sub>               | β-hidroxi-dodecenoil [213] 55,59 e 113                 | 7                          | 32    | 100  |
| C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> / C <sub>14:2</sub>              | β-hidroxi tetra-di-decenoil [239] 59                   | 40                         | 71    | 13   |
| C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> /C <sub>14:1</sub>               | β-hidroxi tetradecenoil [241] 59, 127, 205, 223        | 14                         | 36    | 86   |
| C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> /C <sub>14:1-OH</sub>            | β-di-hidroxi tetradecenoil [257] 59, 81, 83, 197       | 0                          | 0     | 84   |
| C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub> C <sub>10:2</sub> C <sub>6</sub> | β-hidroxi-di-decenoil-β-hidroxi-hexanoato              | 8,5                        | 22    | 30   |
| C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> C <sub>18:1-OH</sub>             | ou ácido ricinolêico [297] 113, 183, 279               |                            |       |      |
| C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>                                  | β-hidroxi-octenoil-β-hidroxi-octanoato                 | 0                          | 67    | 0    |
| C <sub>8:1</sub> C <sub>8</sub>   | [299] 59, 141, 155, 253, 281                           |                            |       |      |
| C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>                                  | β-hidroxi-octanoil-β-hidroxi-decenoato                 | 8                          | 13    | 0    |
| C <sub>8</sub> C <sub>10:1</sub>  | [327] 159, 213, 281                                    |                            |       |      |
| C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>                                  | β-hidroxi-octanoil-β-hidroxi-decanoato                 | 5,5                        | 14,5  | 0    |
| C <sub>10</sub> C <sub>8</sub> /C <sub>8</sub> C <sub>10</sub>                  | [329] 59, 159, 187, 283, 311                           |                            |       |      |
| C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>                                  | β-hidroxi-decanoil-β-hidroxi-decanoato                 | 5                          | 6     | 0    |
| C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>   | [357] 159, 187, 215, 239, 279, 311                     |                            |       |      |
| C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>                                  | β-hidroxi-dodecenoil-β-hidroxi-dodecenoato             | 0                          | 0     | 12,7 |
| C <sub>12:1</sub> C <sub>12:1</sub>   | [409] 151, 195, 213                                    |                            |       |      |
| C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>                                  | β-hidroxi-dodecanoil-β-hidroxi-dodecenoato             | 0                          | 0     | 14   |
| C <sub>12:1</sub> C <sub>12</sub> / C <sub>12</sub> C <sub>12:1</sub>           | [411] 113, 197, 213, 215                               |                            |       |      |
| C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>                                  | β-hidroxi-dodecenoil-β-hidroxi-tetradecenoato          | 0                          | 0     | 41   |
| C <sub>12:1</sub> C <sub>14:1</sub>   | [437] 213, 223, 241                                    |                            |       |      |
| C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>                                  | β-hidroxi-dodecenoil-β-dihidroxi-tetradecenoato        | 0                          | 0     | 43   |
| C <sub>12:1</sub> C <sub>14:1</sub> / 14:1C <sub>12:1</sub>                     | [453] 195, 213, 239, 257                               |                            |       |      |
| C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub>                                  | β-hidroxi-tetradecenoil-β-                             | 0                          | 0     | 29   |
| C <sub>14:1</sub> C <sub>14:1</sub> /   | dihidroxi-tetradecenoato                               |                            |       |      |
| C <sub>14:1</sub> C <sub>14:1</sub>   | [481] 213, 223, 239, 241, 257, 285                     |                            |       |      |

O perfil de β-hidroxiácidos das amostras provenientes do óleo de girassol e borra de milho foram semelhantes já foram descritos na literatura (LÉPINE et al., 2002; SHEN et

al., 2005). De acordo com Déziel et al., 2003 esses ácidos graxos não são provenientes da degradação dos ramnolipídios e sim intermediários dos mesmos, além disso, apresentaram evidências de que o gene *rhlA* é requerido para a biossíntese dos ácidos graxos hidroxilados, e que estes possuem atividade surfactante, sendo capazes de reduzir a tensão superficial da água para valores inferiores ao alcançado pelos ramnolipídios. Outra evidência da propriedade surfactante desses ácidos graxos, apresentada pelos mesmos autores, é que linhagens mutantes de *Pseudomonas rhIB*<sup>-</sup>, capazes de produzir ácidos graxos hidroxilados, mas não ramnolipídios, apresentaram movimentação do tipo natação, a qual é dependente de agentes tensoativo, enquanto *rhlA*<sup>-</sup> mutantes, não apresentaram capacidade de translocação.

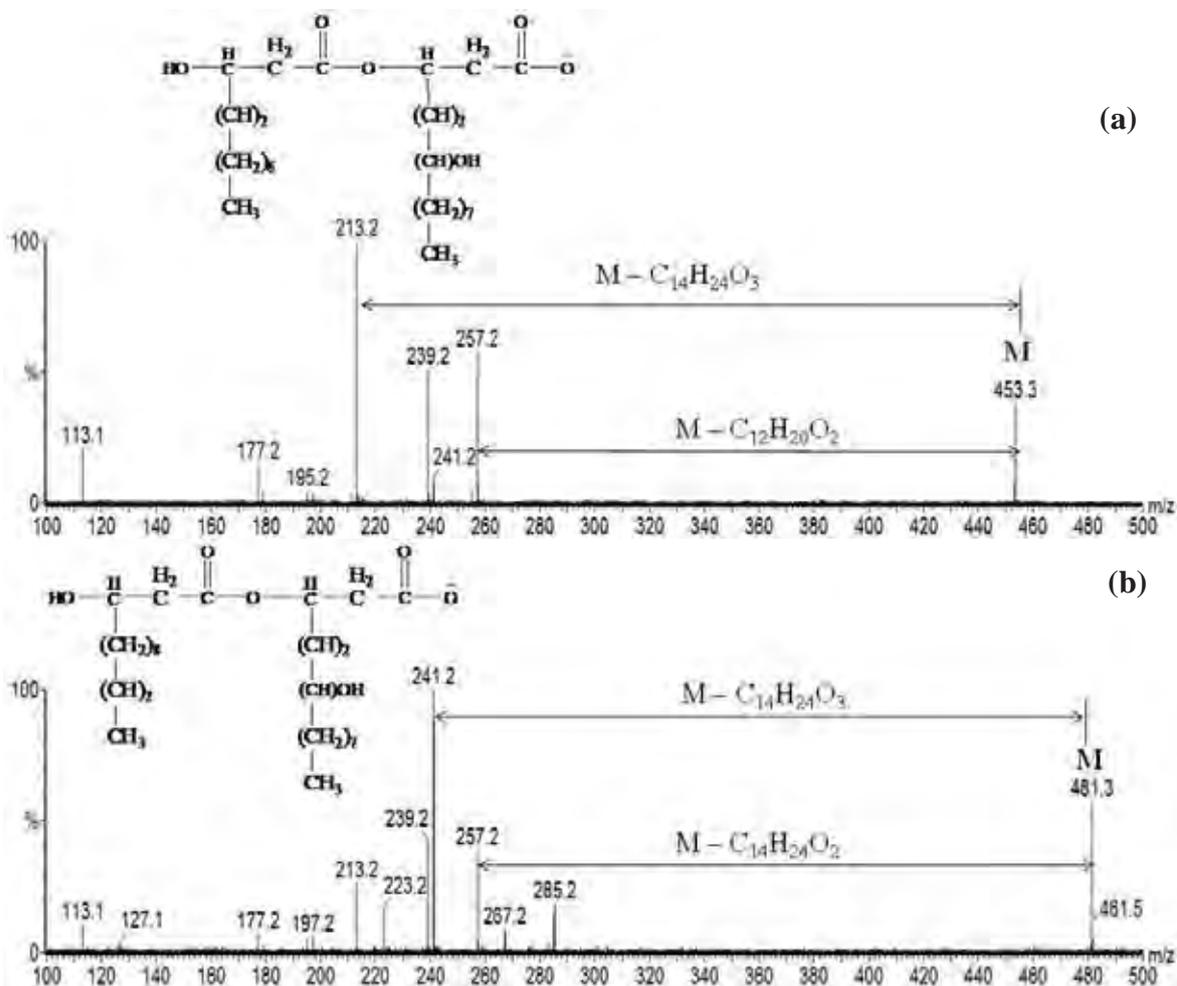
Ao utilizar óleo de mamona como fonte de carbono, obteve-se maior proporção e peculiaridade na composição dos ácidos graxos hidroxilados. O íon *m/z* 257, só foi observado nesta amostra, com uma abundância relativa de 84% e sua fragmentação indicou que ele corresponde a um di-hidroxiácido C<sub>14:1</sub> (Fig. 6.11a).



**Figura 6.11** - ESI (-) – MS/MS Do íon *m/z* 257 (a) e *m/z* 437 (b) proveniente da amostra de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 a partir de óleo de mamona

De acordo com a fragmentação do íon  $m/z$  437, este  $\beta$ -hidroxiácido foi identificado como  $C_{14:1}C_{12:1}$  (Fig. 6.11b). De acordo com a compilação dos homólogos de ramnolipídios existentes (LÉPINE et al., 2002, ABDEL-MAWGOUD et al. 2010, NIE et al., 2010), não há registros de ácidos graxos, associados ou não à moléculas de ramnose, que apresentassem tal constituição.

O ácido graxo di-hidroxi-tetradecenóico ( $m/z$  257) foi encontrado ligado à  $C_{12:1}$  ( $m/z$  453) e  $C_{14:1}$  ( $m/z$  481), o que foi evidenciado pela fragmentação de tais íons (Fig. 6.12).



**Figura 6.12** - ESI (-) – MS/MS do íon  $m/z$  453 (a) e  $m/z$  481 (b) proveniente da amostra de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 a partir de óleo de mamona

A produção de di e tri-hidroxiácidos por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de ácido ricinolêico, principal componente do óleo de mamona, foi descrita por Kim et al., (2000c) e Kuo et al., (1998), que relatam a produção de 10, 12-dihidroxi-8-octadecenóico e 7,10,12-trihidroxi-8-octadecenóico, respectivamente. A adição de grupos hidroxil aos

ácidos graxos, permite que estes apresentem propriedades especiais como alta viscosidade e reatividade quando comparado aos ácidos graxos não hidroxilados, o que permite sua aplicação na produção de resinas, lubrificantes, cosméticos, plásticos e outros, além disso, apresentam atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (HOU AND FORMAN 2000; SHIN ET AL. 2004; BAE et al., 2007).

A confirmação e completa elucidação das estruturas correspondentes aos íons  $m/z$  257, 453 e 481, serão feitas futuramente com auxílio das técnicas de Infravermelho por Transformada de Fourier, Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas – (MS<sup>3</sup>).

O número de homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI **2A1**, nas condições adotadas neste estudo, foram nove, dentre mono e di-ramnolipídios. Com exceção de RhaC<sub>8</sub>C<sub>10</sub> ( $m/z$  475), que não foi produzido com óleo de mamona, os demais foram encontrados, ainda que em diferentes proporções, nas três fontes de carbono avaliadas, entretanto os íons  $m/z$  503 (RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e 649 (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) foram predominantes em todas as amostras avaliadas (Tabela 6.2 e Fig. 6.10). Nitschke et al., (2010) reporta a produção de 10 homólogos de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI ao utilizar borra de óleo de soja como fonte de carbono.

A variação na composição está associada principalmente à linhagem, composição do meio de cultura, condições de cultivo e idade da cultura (MATA-SANDOVAL et al., 1999) e as propriedades físico-químicas dos ramnolipídios podem ser influenciadas pela composição de homólogos, os mono-ramnolipídios, por exemplo, possuem concentração micelar crítica mais alta, além de se ligarem mais fortemente a metais catiônicos do que os di-ramnolipídios (PERFUMO et al., 2006).

**Tabela 6.1** – Composição química e abundância relativa dos homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 (O.G – óleo de girassol; B.O.M – borra de óleo de milho, O.M – óleo de mamona)

| Composição Elementar | Estrutura/<br>Insaturações                           | [M-H] <sup>-</sup><br>m/z  | Abundância Relativa (%) |                    |                    |     |      |
|----------------------|--|--|-------------------------|--------------------|--------------------|-----|------|
|                      |  |  | O.G                     | B.O.M              | O.M                |     |      |
| Ramnolipídios        | C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>       | RhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub> <sup>(a)</sup>                               | 8                       | <sup>(a)</sup> 2,9 | 9,7                | 0   |      |
|                      |  | RhaC <sub>10</sub> C <sub>8</sub> <sup>(b)</sup>                               |                         | <sup>(b)</sup> 2,6 |                    |     |      |
|                      | C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>       | RhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>   | 503                     | 100                | 100                | 100 |      |
|                      | C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>       | RhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub> /<br>RhaC <sub>12:1</sub> C <sub>10</sub> | 529                     | 7,8                | 8,8                | 12  |      |
|                      | C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>       | RhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub> <sup>(a)</sup>                              | 531                     | 9                  | <sup>(a)</sup> 3,7 | 10  | 16   |
|                      |  | RhaC <sub>12</sub> C <sub>10</sub> <sup>(b)</sup>                              |                         |                    | <sup>(b)</sup> 1,7 |     |      |
|                      | C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>      | RhaRhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub>   | 621                     | 3                  | 2,4                | 5   | 3,6  |
|                      |  | RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>8</sub>   |                         |                    | 1,8                |     |      |
|                      | C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>      | RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>  | 649                     | 73                 |                    | 91  | 81   |
|                      | C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>      | RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub> <sup>(c)</sup>                         | 675                     | 7                  | <sup>(c)</sup> 6,7 | 8   | 8,5  |
|                      |  | RhaRhaC <sub>12:1</sub> C <sub>10</sub> <sup>(d)</sup>                         |                         |                    | <sup>(d)</sup> 0,5 |     |      |
|                      | C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>      | RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub> <sup>(e)</sup>                           | 677                     | 12,7               | <sup>(e)</sup> 8   | 14  | 18,8 |
|                      | RhaRhaC <sub>12</sub> C <sub>10</sub> <sup>(f)</sup> |  |                         | <sup>(f)</sup> 2,5 |                    |     |      |

O perfil de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 nas diferentes fontes de carbono foi muito semelhante, entretanto o mesmo não foi observado para os ácidos graxos hidroxilados. Quando consideramos o óleo de mamona, observa-se alta abundância relativa de íons correspondentes a ácidos graxos com cadeias alquílicas com dez ou mais carbonos, o emprego desta fonte de carbono parece ter favorecido a via de síntese desses lipídios. Mata-Sandoval et al., (2001) observaram que a variação da fonte de carbono não alterou a composição de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* UG2, o que corrobora nossos resultados. Por outro lado, Déziel et al., (1999) descrevem alteração qualitativa e quantitativa nos homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* 57RP a partir de naftaleno ou manitol.

As fragmentações dos íons mais abundantes, m/z 503 e 649, podem ser vista na Fig. 6.13, comprovando a composição lipídica e glicídica destes homólogos.

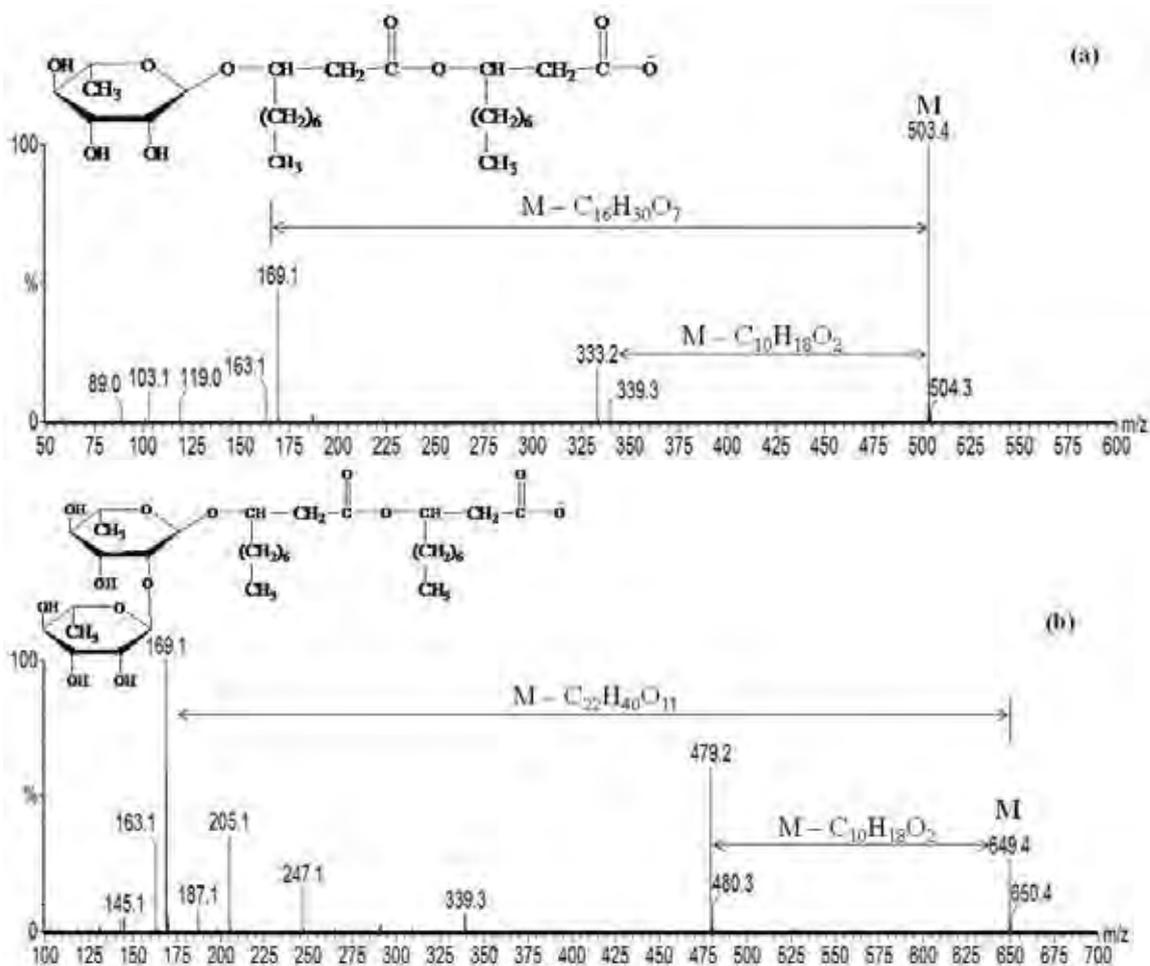
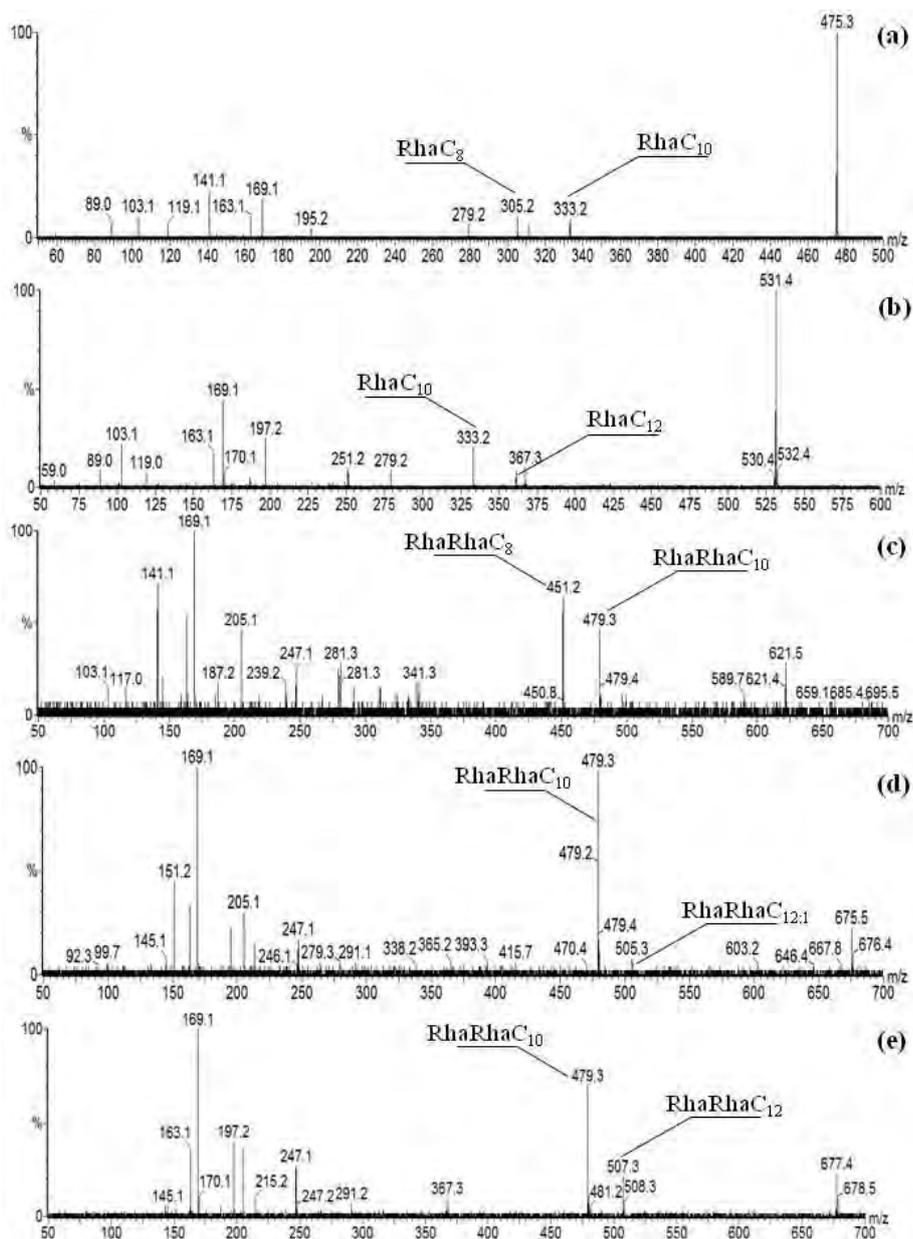


Figura 6.13 - ESI (-) – MS/MS do íon  $m/z$  503 (a) e  $m/z$  649 (b)

Os dois principais íons resultantes da fragmentação de  $m/z$  503 (Ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato) foram  $m/z$  333 e 169, que se originam a partir da ruptura da ligação éster entre as cadeias alquílicas, resultando nos fragmentos RhaC<sub>10</sub> ( $m/z$  333) e C<sub>10</sub> ( $m/z$  169). O mesmo tipo de fragmentação originou os principais íons para o homólogo di-Ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> –  $m/z$  649).

A maior abundância dos íons referente aos homólogos RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> e RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> indica preferência da ramnosiltransferase (RhlB) por substratos com dez carbonos, o que é reforçado pela baixa abundância de íons correspondente à ácidos graxos  $\beta$ -hidroxidecanóicos (Tabela 6.1). De acordo com Lépine et al., (2002) a enzima ramnosiltransferase (RhlB) tem preferência por substratos de cadeia mais longa e sem insaturações. A fragmentação dos íons correspondentes à ramnolipídios contendo cadeias alquílicas com diferentes números de carbono permitiu a determinação da posição dos ácidos graxos presentes na estrutura. Os fragmentos gerados após a ruptura da ligação éster entre os ácidos graxos para estes ramnolipídios foram:  $m/z$  475 (RhaC<sub>8</sub>C<sub>10</sub>/ RhaC<sub>10</sub>C<sub>8</sub>) –

$m/z$  305 (RhaC<sub>8</sub>) e 333 (RhaC<sub>10</sub>);  $m/z$  531 (RhaC<sub>10</sub>C<sub>12</sub>/ RhaC<sub>12</sub>C<sub>10</sub>) -  $m/z$  333 (RhaC<sub>10</sub>) e 361 (RhaC<sub>12</sub>);  $m/z$  621 (RhaRhaC<sub>8</sub>C<sub>10</sub>/ RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>8</sub>) -  $m/z$  451 (RhaRhaC<sub>8</sub>) e 479 (RhaRhaC<sub>10</sub>);  $m/z$  675 (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>/ RhaRhaC<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub>) -  $m/z$  479 (RhaRhaC<sub>10</sub>) e 505 (RhaRhaC<sub>12:1</sub>) e por último  $m/z$  677 (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>12</sub>/ RhaRhaC<sub>12</sub>C<sub>10</sub>) -  $m/z$  479 (RhaRhaC<sub>10</sub>) e 507 (RhaRhaC<sub>12</sub>) (Fig. 6.14).



**Figura 6.14** - ESI (-) – MS/MS dos íons  $m/z$  475 (a),  $m/z$  531(b),  $m/z$  621(c),  $m/z$  675 (d) e  $m/z$  677(e).

Em todos os casos analisados, observou-se uma tendência à formação de ramnolipídios com cadeias alquílicas com menor número de carbonos associadas à ramnose. No caso onde havia insaturação no ácido graxo (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>) a diferença foi

ainda maior, já que o íon correspondente à estrutura RhaC<sub>10</sub>, após a fragmentação, apresentou abundância relativa de 96%. Déziel et al. (2000) observaram o mesmo, e relatam uma maior abundância de homólogos com cadeia mais curta de ácidos graxo adjacente à unidade de açúcar.

Os resultados obtidos com as fermentações e análise por espectrometria de massas indicam que a síntese da porção lipídica dos ramnolipídios, quando se fornece fonte de carbono hidrofóbica, pode não ser síntese *de novo*, já que com o fornecimento de uma fonte de carbono contendo ácidos graxos hidroxilados (ácido ricinolêico) houve a produção de ácidos graxos di-hidroxilados. De acordo com Zhu and Rock (2008) a estereoquímica dos  $\beta$ -hidroxiácidos dos ramnolipídios correspondem a intermediários da biossíntese dos ácidos graxos e não à intermediários da  $\beta$ -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). De acordo com Hoang e Schweizer (1999) a maquinaria enzimática de *P. aeruginosa* para o ciclo FASII é a mesma descrita para *E. coli*. Entretanto nossos resultados evidenciam que podem existir outras enzimas que seriam responsáveis pelo desvio de ácidos graxos da  $\beta$ -oxidação, os quais, pela ação de ramnosiltransferases, receberiam moléculas de ramnose, formando os homólogos dos ramnolipídios.

Como já descrito anteriormente, com o emprego de óleo de mamona como fonte de carbono detectou-se maior abundância relativa de íons referente à hidroxiácidos, neste caso a produção de ramnose pode ter sido o fator limitante na biossíntese de ramnolipídios, já que, a partir da oxidação dos ácidos graxos fornecidos como fonte de carbono ocorre o desvio dos mesmos para a síntese de hidroxiácidos, reduzindo a formação de acetil-CoA. No ciclo do glioxilato a acetil-CoA é convertida à succinato, que é transformado em malato no ciclo do ácido cítrico. O malato é oxidado à oxaloacetato que pela gliconeogênese é convertido em hexoses e posteriormente à ramnose, cuja produção seria menor devido à redução na formação de acetil-CoA durante a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos.

## 7.0 CONCLUSÕES

- A melhor fonte de carbono, dentre todas as avaliadas, foi o óleo de girassol;
- Água de maceração de milho favorece o aumento da produção de ramnolipídios, quando utilizada em associação com resíduos do processamento de óleo como fonte de carbono;
- A linhagem mutante *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, foi a que apresentou maior produção de ramnolipídios, com um aumento de 70% quando comparada à concentração obtida com a bactéria selvagem;
- Excesso de fonte de carbono promove aumento significativo na produção de ramnolipídios;
- As condições estabelecidas para a produção em biorreator foram adequadas para se alcançar uma alta produção do biossurfactante;
- Intensa produção de ramnolipídios pode ocorrer na presença de nitrogênio e durante a fase logarítmica de crescimento do micro-organismo;
- O aparato mecânico utilizado para a quebra da espuma quando acionado diminuiu o volume da mesma comprovando sua eficiência;
- A adição de NaCl às soluções de ramnolipídios não altera sua atividade de superfície, entretanto diminui o número e tamanho dos agregados formados em soluções sem controle de pH. Soluções com NaCl e pH controlado em 6, 7 e 8 apresentaram aumento no comportamento de agregação.
- A adição de EtOH às soluções de ramnolipídios promove redução na concentração micelar crítica e favorece o comportamento de agregação dos monômeros. A atividade de emulsificação com tais soluções, só ocorre quando há controle de pH.
- A composição de ácidos graxos produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 variou qualitativa e quantitativamente com a variação das fontes de carbono utilizadas;
- O perfil de ácidos graxos produzidos a partir do óleo de mamona indicam que a síntese da porção lipídica dos ramnolipídios, quando se fornece fonte hidrofóbica, pode ser via  $\beta$ -oxidação e não síntese *de novo*;
- A composição de homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 variou quantitativamente com as diferentes fontes de carbono avaliadas;

## 8.0 PESQUISAS FUTURAS

- Identificação do local da mutação no genoma de *P. aeruginosa* LBI **2A1**;
- Investigar a relação entre resistência à antibióticos e produção de ramnolipídios;
- Estudar a influência dos genes *ptxR*, *mexX*, *rpoS* e *rhlG* na produção de ramnolipídios;
- Avaliar a produção de ramnolipídios empregando resíduos do processamento de óleo e o meio mineral livre de cálcio;
- Elucidar e comprovar as estruturas propostas para os ácidos graxos produzidos por *P. aeruginosa* LBI **2A1**, em óleo de mamona como fonte de carbono.

## 9.0 REFERÊNCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, Washington, v.17, p. 1367-1371, 2001.
- ABDEL- MAWGOUD, A.M; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, p. 1323-36, 2010.
- ABDEL- MAWGOUD, A.M.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MÜLLER, M.M.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation and bioengineering of production: In: Soberón-Chavez Glória (Ed.) Biosurfactants from genes to application. 1ª ed. 2011, p. 13 – 55.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antartica*. **Biotechnol. Letters**, Dordrecht, v. 22, p. 313-316, 2000.
- Aendekerk, S.; Ghysels, B.; Cornelis, P.; Baysse, C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiol.**, v. 148, p. 2371-2381, 2002.
- AIRES, J. R.; KÖHLER, T.; NIKAIDO, H.; PLÉSIAT, P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 2624–2628, 1999.
- ALBERICI, R.M.; SIMAS, R.C.; SANVIDO, G.B.; ROMÃO, W.; LALLI, P.M.; BENASSI, M.; CUNHA, I.B.S.; EBERLIN, M.N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “rel world”. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, p. 265 - 294, 2010.
- ALVAREZ-ORTEGA, C.; HARWOOD, C.S. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. **Mol Microbiol.**, v. 65, p. 153–165, 2007.
- ARA, I.; MULLIGAN, C. N. Conversion of Cr(VI) in water and soil using rhamnolipid. 61. St Canadian Geotechnical Conference, Edmonton, Sept. 20-24, 2008.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Appl. Environ. Microbiol**, 45, 162-168, 1996.
- BAE, J.H.; KIM, D.; SUH, M.; OH, S.; LEE, I.; KANG, S.; HOU, C.T.; KIM, H. Production and identification of a novel compound, 7,10-dihydroxy-8(E)-hexadecenoic acid from palmitoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 75, p. 435–440, 2007.

- BAGGE, N.; HENTZER, M.; ANDERSEN, J.B.; CIOFU, O.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N.; Dynamics and spatial distribution of  $\beta$ -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48, 1168–1174, 2004.
- 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.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **J. Food Eng.**, Essex, v.54, p.283-288, 2002.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, v.85, p.1-8, 2004.
- BENINCASA, M.; ACCORSINI, F.R. *Pseudomonas aeruginosa* BI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Biores. Technol.**, Essex, v. 99, p. 3843 – 3849, 2008.
- BERTANI, I.; SEVO, M.; KOJIC, M.; VENTURI, V. Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. **Arch. Microbiol.**, v. 180, p. 264–271, 2003.
- BRINKMAN, F.S.L.; MACFARLANE, E.L.A.; WARRENER, P.; HANCOCK, R.E.W. Evolutionary Relationships among Virulence-Associated Histidine Kinases. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5207-5211, 2001.
- BRYAN, L.E.; O'HARA, K.; WONG, S. Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 26, p. 250-255, 1984.
- BRYAN, L. E.; VAN DEN ELZEN, H. M. Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 12, p. 163–77, 1977.
- CABRERA-VALLADARES, N.; RICHARDSON, A.P.; OLVERA, C.; TREVIÑO, L.G.; DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; Soberón-Chávez, G. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.73, p. 187–194, 2006.
- 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.; ALTAHMAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene Encodes a NADPH-dependent  $\beta$ -ketoacyl Reductase Which is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n. 17, p. 4442 – 4451, 1998.

- CARDINAL, E.V.; HEDRICK, L.R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content, **J. Biol. Chem.**, v. 172, p. 609–612, 1948.
- CARTY, N.L., LAYLAND, N., COLMER-HAMOOD, J.A., CALFEE, M.W., PESCI, E.C., HAMOOD, A.N. PtxR modulates the expression of QS-controlled virulence factors in the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 782–794, 2006.
- CATHARINO, R.R.; MILAGRE, H.M.S.; SARAIVA, S.A.; GARCIA, C.M.; SCHUCHARDT, U.; EBERLIN, M.N. Biodiesel typification and quality control by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3698-3701, 2007.
- CHAMPION, J.T.; GILKEY, J.C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R.M. Electron Microscopy of rhamnolipids (biosurfactant) morphology: effect of pH, cadmium and octadecane. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 170, p. 569-574, 1995.
- CHANDRASEKARAN, E.V.; BEMILLER, J.N. Constituent analysis of glycosaminoglycans. In: Methods in Carbohydrate Chemistry, v.III, Academic Press, Nova York, p. 89-96, 1980.
- CHANG, J.S.; CHOU, C.L.; LIN, G. H.; SHEU, S. Y.; CHEN, W.M. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. **Syst. and Appl. Microbiol.**, Stuttgart, v. 28, n. 2, p. 137-144, 2005.
- CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L.K. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 72, p. 25-33, 2001.
- CHEN, S.Y.; LU, W.B.; WEI, Y.H.; CHEN, W.M.; CHANG, J.S. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa*
- COHEN, R.; EXEROWA, D. Surface forces and properties of foam films from rhamnolipid biosurfactants. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.134–135, p. 24–34, 2007.
- COSTA, S.G.V.A.O; NITSCHKE, M.; 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.
- CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.
- DEKIMPE, V., DEZIEL, E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. **Microbiol.**, v.155, p.712–723, 2009

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

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

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

DÉZIEL, E.; LEPINI, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanooyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.*, New York, v. 149, p. 2005 – 2013, 2003.

DIGGLE, S.P.; WINZER, K.; CHHABRA, S.R.; WORRALL, K.E.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.*, v. 50, p. 29–43, 2003.

DOWD, M.K. Compositional characterization of cottonseed soapstocks. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 73, p. 1287-1295, 1996.

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

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

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

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

GALBRAITH, L.; WILKINSON, S.G.; LEGAKIS, N.J.; GENIMATA, V.; KATSORCHIS, T.A.; RIETSCHER, E.T. Structural alterations in the envelope of a gentamicin resistant rough mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Microbiol.*, v. 135b, p. 121-136, 1984.

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

GANESH, K.C.; MAMIDYALA, S.K.; DAS, B.; SRIDHAR B.; DEVI, G.S.; KARUNA, M.S. Synthesis of Biosurfactant-Based Silver Nanoparticles with Purified Rhamnolipids

Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, p. 1061– 68, 2010.

GOODERHAM, W.J.; HANCOCK, R.E.W. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol Re.**, v 33, p. 279–294, 2009

GOODERHAM, W.J.; GELLATLY, S.L.; SANSCHAGRIN, F.; MCPHEE, J.B.; BAINS, M.; COSSEAU, C.; LEVESQUE R.C.; HANCOCK, R.E.W. The sensor kinase PhoQ mediates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol.**, v.195, p. 699-711, 2009

GOSWAMI, D.; SEN, R.; BASU, J. K.; DE, S. Surfactant Enhanced Ricinoleic Acid Production using *Candida rugosa* Lipase. **Bioresour. Technol.**, 101, p. 6-13, 2010

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.

GUNN, J. S.; MILLER, S. I. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. **J Bacteriol.**, v. 178, p. 6857-6864, 1996.

GUPTA, M.K. Sunflower oil. In GUNSTONE, F.D. Vegetables oil in food technology: composition, properties and uses. Blackwell Publishing, 2002.

HAN, F.; HE, X.; HUANG, J.; LI, Z.; WANG, Y.; FU, H. Surface Properties and Aggregates in the Mixed Systems of Bolaamphiphiles and Their Oppositely Charged Conventional Surfactants. **J. Phys. Chem. B.**, v. 108, p. 5256-5262, 2004.

HANCOCK, R.E.; SPEERT, D.P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resist Updat.**, v. 3, p. 247–255, 2000.

HELVACI, S.S.; PEKER, S., ÖZDEMİR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloid Surf. B-Biointerfaces.**, v. 35, p. 225 - 233, 2004.

Henning, S.B.; Santos, P.M.P.; Lovaglio, R. B.; Costa, S.G.V.A.O.; Contiero, J.; Loshchagin, P.E. Factors affecting rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Research J. Biotechnol.**, v. 3, n. 1, p. 45 – 49, 2008.

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

HOANG T.T.; SCHWEIZER H.P. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 5489-5497, 1999.

HOMMEL, R.K.; RATLEDGE, C. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules. In: KOSARIC, N, Biosurfactants: production, properties and applications, v. 48 New York: Marcel Dekker, 1993.

HOU, C.T.; FORMAN, R.J. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by hydroxy fatty acids. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 24, p.275–276, 2000)

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

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

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

JENSEN, V.; LONS, D.; ZAOU, C.; BREDENBRUCH, F.; MEISSNER, A.; DIETERICH, G.; MUNCH, R.; HAUSSLER, S. RhIR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and – independent pathways. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 8601–8606, 2006.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TÜMMLER, B.; Quorum-sensing: the Power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environ. Microbiol.**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 459 – 471, 2005.

KARLOWSKY, J.A.; ZELENITSKY, S.A.; ZHANEL, G.G. Aminoglycoside adaptive resistance. **Pharmacoth.**, v. 17, p. 549 – 555, 1997.

KIM, H.; KUO, T.M.; HOU, C.T. Production of 10,12-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid, an intermediate in the conversion of ricinoleic acid to 7,10,12-trihydroxy-8(E)-octadecenoic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 167–172, 2000.

KOCH, A.K. *et al.* Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 4212-4219, 1991.

KÖHLER, T.; MICHÉA-HAMZEPOUR, M.; HENZE, U.; GOTOH, N.; CURTY, L.K.; PECHÈRE, J.C. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 345–354, 1997.

KÖHLER, T.; CURTY, L. K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHÈRE, J. C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 182, p. 5990-5996, 2000.

KÖHLER, T.; VAN DELDEN, C.; CURTY, L.K.; HAMZEHPOUR, M.M.; PECHERE, J. Overexpression of the MexEF-OprN Multidrug Efflux System Affects Cell-to-Cell Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5213-5222, 2001.

KUO, T.M.; MANTHEY, L.K.; HOU, C.T. Fatty Acid Bioconversions by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. **JAOCs**, v. 75, p. 875-879, 1998.

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.

LATIFI, A.; FOGLINO, M.; TANAKA, K.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. **Mol. Microbiol.**, Salem, v. 21, n. 6, p. 1137 – 1146, 1996.

LATIFI, A.; WINSON K.M.; FOGLINO, M.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.A.B.; LAZDUNSKI, A.; WILLIAMS, P. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Mol. Microbiol.**, Salem, v. 17, p. 333 – 344, 1995.

LEITERMANN, F., WALTER, V., SYLDATK, C., HAUSMANN, R. Rhamnolipids. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3037–3051, 2010.

LÉPINE, F.; DÉEZIEL, E.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. **J. Mass Spectrom.**, v. 37, p. 41–46, 2002.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1948–1953, 1995.

LI, X.Z., ZHANG, L., POOLE, K. Interplay between the MexA–MexB– OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 45, 433–436 (2000).

LIGGETT, R.W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriol Rev.**, v. 12, n. 4, p. 297 – 311, 1948.

LIN, S.C. *et al.*, Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 23, p. 267-273, 1998.

LINARES, J.F.; MORENO, R.; FAJARDO, A.; MARTÍNEZ-SOLANO, L.; ESCALANTE, R.; ROJO, F.; MARTÍNEZ, J.L. The global regulator Crc modulates

metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 3196–3212, 2010.

LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S.G.V.A.O.; LIMA, C.J.B.; CORTEZI, M.; CONTIERO, J. Effect of C/N ratio and Physicochemical Conditions on the production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Res. J. Biotechnol.**, v.5, n.3, p. 19 – 24, 2010.

LOVAGLIO, R.B.; SANTOS, F.J.; JAFELICCI JR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipids emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloid Surf. B-Biointerfaces.**, v. 85, p. 301-305, 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.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. HPLC method for the characterization of rhamnolipids mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **J. Chromatogr. A**, v. 864, p. 211-220, 1999.

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.

MACFARLANE, E.L.A.; KWASNICKA, A.; HANCOCK, R.E.W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. **Microbiol.**, v. 146, p. 2543–2554, 2000.

McPHEE, J.B.; LEWENZA, S.; HANCOCK, R.E. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol.**, v. 50, p. 205–217, 2003.

McPHEE, J. B., BAINS, M., WINSOR, G., LEWENZA, S., KWASNICKA, A., BRAZAS, M. D., BRINKMAN, F. S. & HANCOCK, R. E. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg<sup>2+</sup>-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.**, v. 188, p. 3995–4006 2006.

MEDINA, G.; JUAREZ, K.; SOBERON-CHAVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer N-butyryl-homoserin lactone. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 377–380, 2003.

MÜLLER, M.M.; HÖRMANN, B.; KUGEL, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Evaluation of rhamnolipids production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in

comparison to the rhamnolipids over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.89, p. 585-592, 2011.

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

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

MULLIGAN, C. N.; 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.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Curr. Op. Coll. Interf. Sci.**, v. 14, p. 372 – 378, 2009.

NIE, M.; YIN, X.; REN, C.; WANG, Y.; XU, F.; SHEN, Q. Novel rhamnolipids biosurfactant produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NY3. **Biotechnol. Advances**, v. 28, p. 635-643, 2010.

NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. **J.Bacteriol.**, v. 178, p. 5853–5859, 1996.

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

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 160, p. 2066-2074, 2010.

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

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

OCHSNER, U. A.; REISER, J.T. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 92, p. 6424 – 6428, 1995.

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

PAINTER, H.A. A review of the literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganism. **Water Res.**, v.4, p. 392 – 450, 1970.

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.

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

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

PEARSON, J.P.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B.H.; GREENBERG, E.P. A second *N*-Acyl homoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 92, p. 1490 – 1494, 1995.

PEARSON, J.P.; VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B.H. Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1203-1210, 1999.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon3degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO231. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.72, p.132-138, 2006.

PIAZZA, G.J., FARRELL, H.M. Generation of ricinoleic acid from castor oil using the lipase from ground oat (*Avena sativa* L.) seeds as a catalyst. **Biotechnol. Lett.**, v. 13, p. 179–184, 1991.

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

Piróllo, M.P.S; Mariano, A.P.; Lovaglio, R.B.; Costa, S.G.V.A.O.; WALTER, V.; Hausmann, R.; Contiero, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 5, p. 1484 – 1490, 2008.

POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 12 – 26, 2004.

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

QIUZHUO, Z.; WEIMIN, C.; JUAN, W.; Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing. **J. Environ. Sci.**, v. 20, p. 975 – 980, 2008.

RAHIM, R.; OCHSNER, U.A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Cloning and Functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Mol. Microbiol.**, Salem, v. 40, n. 3, p. 708 – 718, 2001.

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.

REILING, H.E.; THANEIOWYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L.H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipids biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 51, p. 985-989, 1986.

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

RIVERA, M.; HANCOCK, R.E.; SAWYER, J.G.; HAUG, A.; MCGROARTY, E.J. Enhanced binding of polycationic antibiotics to lipopolysaccharide from an aminoglycoside-supersusceptible, *tolA* mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 32, p. 649 – 655, 1988.

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.; FROSCHE, 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.

ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense**, 2010. 133f. Tese (Doutorado em Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SAIKA, T.; HASEGAWA, M.; KOBAYASHI, I.; NISHIDA, M. Ionic binding of <sup>3</sup>H-gentamicin and short-time bactericidal activity of gentamicin against *Pseudomonas*

*aeruginosa* isolates with different lipopolysaccharide structures. **Chemother.**, v. 45, p. 296-302, 1999.

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.

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

SANTA ANNA, L.M.; SORIANO, A.U.; GOMES, A.C.; MENEZES, E.P.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; PEREIRA JR., N. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, p. 687–691, 2007.

SARKISOVA, S.; PATRAUCHAN, M.A.; BERGLUND, D.; NIVENS, D.E.; FRANKLIN, M.J. Calcium-Induced Virulence factors Associated with the Extracellular Matrix of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 13, p. 4327 – 4337, 2005.

SHABTAI, Y.; DAYA-MISHNE, N. Production, purification and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 174-180, 1992.

SCHUREK, K.N.; MARR, A.K.; TAYLOR, P.K.; WIEGAND, I.; SEMENEC, L.; KHAIRA, B.K.; HANCOCK, R.E.W. Novel Genetic Determinants of Low-Level Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 52, p. 4213–421, 2008.

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

SHEN, W.; YANG, S.; LI, X. Electrospray ionization mass spectrometry detection of rhamnolipids and their acid precursors in *Pseudomonas* sp. BS-03 cultures. **China Biotechnol.**, v. 25, p. 83-87, 2005.

SHIN, S.Y.; KIM, H.R.; KANG, S.C. Antibacterial activity of various hydroxy fatty acids bioconverted by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. **Agric Chem Biotechnol.**, v. 47, p. 205–208, 2004.

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

SIEGMUND, I.; FRITZ, W. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnol. Tech.**, Kew, v.5, n.4, p.265-268, 1991.

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

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

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnol.** Amsterdam, v. 22, n° 3, 142-146, 2004

SMITH, C.A.; BAKER, E.N.; Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. **Curr. Drug targets Infect. Disord.**, v. 2, p. 143 – 160, 2002.

SONCINI, F. C.; GROISMAN, E. A. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. **J Bacteriol.**, v. 178, p. 6796-6801, 1996.

Sotirova, a.; Spasova,D.; Vasileva-TonkovA,E.; Galabova, D. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Res.**, v. 164, p. 297 – 303, 2009.

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

SYLDATK, C.; 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, 1985.

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

TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M.M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Iranian Biomedical Journal**, v. 8, p. 25-31, 2004.

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.

TURNIDGE, J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 17, p. 503 – 528, 2003.

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

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.

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

VINCKX, T.; WEI, Q.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. **Microbiol.**, v. 156, p. 678-686, 2010.

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

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, 2008, p. 129 – 158.

WANG, X.; GONG, L.; LIANG, S.; HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 433-443, 2005.

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

WEI, Q.F.; MATHER, R.R.; FOTHERINGHAM, A.F. Oil removal from used sorbents using a biosurfactant. **Biores. Technol.**, Orlando, 96, p. 331-334, 2005.

WESTBROCK-WADMAN, S.; SHERMAN, D.R.; HICKEY, M.J.; COULTER, S.N.; ZHU, Y.Q.; WARRENER, P.; NGUYEN, L.Y.; SHAWAR, R.M.; FOLGER, K.R. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Efflux Pump Contributing to Aminoglycoside Impermeability. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 2975–2983, 1999.

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

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

WU, J. Y.; YEH, K.L.; LU, W.B.; LIN, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 5, p. 1157-1164, 2007.

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.

ZHANG, Q.; JU, L.K. Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of  $\beta$ -glucosidase from cellulase enzyme mixture. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 48, p. 175–80, 2011.

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