

**Estudo da Produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*:
Ramnolipídios e Polihidroxicanoatos (PHAs).**

Siddhartha Georges Valadares Almeida de Oliveira Costa

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Nitschke

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 (Área
de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro

Janeiro - 2010

547.29 Costa, Siddhartha Georges Valadares Almeida de Oliveira
C837e Estudo da produção de metabólitos por pseudomonas
aeruginosa: ramnolipídios e polihidroxicanoatos (phas) /
Siddhartha Georges Valadares Almeida de Oliveira Costa. -
Rio Claro : [s.n.], 2010
136 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Co-Orientador: Marcia Nitschke

1. Fermentação. 2. Biossurfactantes. 3. Phas. 4. Resíduos
agro-industriais. I. Título.

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

TESE DE DOUTORADO defendida em 22.01.2010

**Estudo da produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*:
Ramnolipídios e Polihidroxicanoatos (PHAs)**

SIDDHARTHA GEORGES VALADARES ALMEIDA DE OLIVEIRA COSTA

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Jonas Contiero

Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Prof. Dr. Marcos Rogério Tótola

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

AGRADECIMENTOS

A confecção e elaboração de uma tese de doutorado é um processo coletivo, apesar de ser reconhecido como um trabalho científico monográfico. A abordagem de um certo tema requer a utilização de metodologias específicas, sejam elas teóricas, de campo, experimental ou histórica. Desde a formulação do projeto inicial até a redação final da tese, várias pessoas contribuem para que o trabalho chegue a um consenso. E este caso não foi diferente, por isso registro aqui a minha imensa gratidão.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, pela orientação, apoio, oportunidade e ensinamento para a elaboração desta tese. Considero você como um exemplo de pesquisador e de pessoa, e isso foi de fundamental importância para o meu crescimento profissional. Muito obrigado pela amizade criada durante estes anos.

Meu muito obrigado a Profa. Dra. Marcia Nitschke, pelas discussões, ideias, correções e orientação ao projeto e tese. Me espelho no seu amor pela pesquisa e na sua dedicação de ensinar e transmitir conhecimento.

A todos os integrantes (Roberta, Cristian, Fabrício, Paulo, Gervásio, Luciana, Keity, Túlio, Rodrigo, Meire, Marcela e Vinícius) e ex-integrantes (Guilherme, Mariana, Márcia) do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI), meus agradecimentos pelas valiosas conversas e discussões que tornaram este trabalho mais leve e fácil de ser conduzido.

Aos professores, funcionários, técnicos de laboratório e estudantes do Dep. de Bioquímica e Microbiologia, UNESP, IB, meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Francois Lépine e Prof. Dr. Eric Déziel pela oportunidade de estágio no laboratório de espectrometria de massa sediada no INRS – Institut Armand Frappier, Laval, Quebec, Canadá. Também agradeço a todos os integrantes do “Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement”, em especial Sylvain Millot e Marie Christine.

A FAPESP pelo apoio financeiro, sendo de fundamental importância para a concretização deste trabalho.

A UNESP, IB, pelo apoio material e didático.

Aos meus pais, pela sólida formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este doutorado, meu eterno agradecimento. Muito

obrigado mãe pelo apoio, paciência, amor e carinho. Pai te agradeço pelo amor me dado estes anos todos. Valeu Rodrigo (irmão) pelas conversas e risadas que me ajudaram a distrair e esquecer um pouco dos problemas.

A toda família Valadares, tias, tios, primas, primos, Vovó e agregados.

Ao Paul e André (Ganso) irmãos e companheiros pelo resto da vida. Não poderia esquecer da Juju e da Nats, irmãzinhas de coração. Valeu mesmo, pelas brincadeiras, cervejas e pelos ótimos momentos que tornaram estes 4 anos inesquecíveis.

A Fernanda pela confiança e correria para que a viagem ao Canadá se concretiza-se.

A todos os meus amigos, tanto de Rio Claro como de Queluz. Afinal não poderia esquecer Queluz, “cidade querida, onde deixei meu amor, saudade da minha vida” (pedacinho do Hino da cidade), e casa de mamãe.

Meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente tiveram participação neste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho visou estudar a produção de biossurfactante e PHAs de *Pseudomonas sp.* em substratos alternativos oriundos do processamento de alimentos bem como determinar as propriedades, composição química e aplicações dos compostos obtidos. Foram isoladas 21 cepas bacterianas, sendo que duas cepas demonstraram capacidade de crescer no meio de cultivo proposto e produzir ramnolipídios e PHAs. Estas cepas foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* e receberam as seguintes terminações: *P. aeruginosa* L2-1 e *P. aeruginosa* B1-3. Com relação a caracterização de ramnolipídios e PHAs, suas composições variaram de acordo com a fonte de carbono e a linhagem utilizada na fermentação. O meio manipueira adicionado com óleo de fritura (MOF) apresentou os melhores resultados, alcançando uma produção de PHA de 39% do peso seco de células e uma produção de ramnolipídios de 660 mg/L. A manipueira se mostrou um substrato alternativo com potencial para a produção de ramnolipídios e PHAs, principalmente quando adicionada com óleo de fritura, além de ser uma solução do ponto de vista ambiental e também agregar valor a estes resíduos. A manipueira adicionada de óleo de fritura pode reduzir os custos de produção permitindo a obtenção concomitante de ramnolipídios e PHAs. O ramnolipídio produzido pela linhagem *P. aeruginosa* L2-1 no substrato manipueira adicionado de óleo de fritura foi recuperado e apresentou excelentes propriedades tenso-ativas, (baixos valores de concentração micelar crítica e de tensão superficial e interfacial, excelente atividade emulsificante e estabilidade da emulsão), além de potencial para uso na remediação de ambientes contaminados, removendo até 89% de petróleo na areia após processo de lavagem, conferindo características semelhantes e algumas vezes melhores que o ramnolipídio comercial JBR599 (Jeneil Biosurfactant Co.).

Palavras-Chave: *Pseudomonas aeruginosa*, biossurfactantes, PHAs, ramnolipídios, resíduos agro-industriais.

ABSTRACT

This work evaluated the rhamnolipid and PHAs production by *Pseudomonas sp.* in alternative low-cost substrates from food processing, determining the properties, applications and chemistry composition of compounds obtained. Were isolated 21 strains, being that 2 isolates were able to growth and produce rhamnolipids and PHAs in the substrates. These bacteria were identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The polymers and surfactants produced were characterized by gas-chromatography mass spectrophotometry (GC-MS) and by high performance liquid chromatography-MS (HPLC-MS), and their composition was found to vary with the carbon source and the strain used in the fermentation. The best overall production of rhamnolipids and PHAs was obtained with cassava wastewater added with waste cooking oil (CWO) as the carbon source, with PHA production corresponding to 39% of the cell dry weight and rhamnolipids production being 660 mg/L. It would appear that CWO has the highest potential as alternative substrate, and its use may contribute to a reduction in the overall environmental impact generated by discarding such residues. The rhamnolipid produced by *P. aeruginosa* L2-1 in CWO showed excellent tension-active properties (low values of critic micellar concentration and superficial and interfacial tensions) and potential to use in remediation of contaminated environmental, removing 89% of petroleum after washing process in sand, with characteristics similar or better than commercial rhamnolipid JBR599 (Jeneil Biosurfactant Co.).

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactants, PHAs, rhamnolipids, agro-industrial wastes.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Representação geral dos mono (a) e diramnolipídios (b).....	22
Figura 2 Fluxograma de uma fábrica de processamento de mandioca.....	25
Figura 3 Representação geral dos PHAs.....	34
Figura 4 Prensagem da mandioca e coleta da água de manipueira (A = prensagem; B = coleta).....	57
Figura 5 Diferentes meios de cultivo para isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes. Placa “A” – teste “cálcio-trioleína”; placa “B” – teste “King B. medium” e placa “C” – teste “Blue-agar”. (1 - L2-1 e 2 - B1-3).....	64
Figura 6 Crescimento (CDW), produção de ramnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato óleo de fritura.....	70
Figura 7 Crescimento (CDW), produção de ramnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato glicerol.....	70
Figura 8 Crescimento (CDW), produção de ramnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato manipueira.....	71
Figura 9 Crescimento (CDW), produção de ramnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato MOF.....	71
Figura 10 Atividade das enzimas lipase e esterase para o microrganismo L2-1 no substrato óleo de fritura.....	75
Figura 11 Atividade das enzimas lipase e esterase para o microrganismo L2-1 no substrato MOF.....	75

Figura 12 Detecção da enzima lipase utilizando meio sólido (placas lipase-tributirina) para o microrganismo L2-1 (1 = substrato MOF; 2 = substrato óleo de fritura; 3 = substrato manipueira e 4 = substrato glicerol).....	76
Figura 13 Consumo de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> L2-1 (CDW = peso seco de células).....	77
Figura 14 Atividade emulsificante do ramnolipídio produzido pelo isolado L2-1 em meio MOF contra óleo de soja, querosene e benzeno.....	95
Figura 15 Atividade emulsificante do ramnolipídio JBR599 contra óleo de soja, querosene e benzeno.....	95
Figura 16 Estabilidade da emulsão para o ramnolipídio produzido pelo isolado L2-1 em meio MOF após 30 dias.....	96
Figura 17 Estabilidade da emulsão para o ramnolipídio JBR599 após 30 dias.....	97
Figura 18 Remoção de petróleo bruto de areia contaminada após o processo de lavagem.....	98
Figura 19 Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem com água destilada.....	100
Figura 20 Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem com solução de ramnolipídio produzido pelo isolado L2-1.....	100
Figura 21 Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem pela solução de ramnolipídio	

JBR599.....	101
Figura 22 Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem pela solução de SDS.....	101
Figura 23 Areia contaminada com petróleo bruto após processo de lavagem. a) solução de ramnolipídio produzido pelo isolado L2-1; b) solução de ramnolipídio JBR599; c) solução de SDS; d) controle (água destilada).....	102
Figura 24 Redução da massa de petróleo bruto de areia contaminada após tratamento à 50 °C por 14 dias.....	104
Figura 25 Remoção de petróleo bruto em areia contaminada por soluções de ramnolipídio após tratamento da areia a 50 °C por 14 dias.....	105
Figura 26 Aderência celular de <i>P. aeruginosa</i> L2-1 contra hexadecano na presença de diferentes concentrações de ramnolipídio.....	107
Figura 27 Inibição do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> L2-1 na presença e ausência de ramnolipídios. A linha marca o valor da E50% (concentração que causa 50% da inibição no crescimento) para o fenol.....	109

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Principais tipos de biotensoativos e microrganismos produtores.....	20
Tabela 2 Características físico-químicas da manipueira utilizada neste trabalho.	56
Tabela 3 Composição de ácidos graxos (%) p/p do óleo de fritura utilizado no trabalho.....	58
Tabela 4 Distribuição das bactérias isoladas a partir das amostras contaminadas e suas respectivas caracterizações (gram, morfologia e identificação a partir de testes bioquímicos).....	60
Tabela 5 Ensaio da produção de ramnolipídios nos diferentes isolados através da medida de tensão superficial e crescimento celular.....	63
Tabela 6 Efeito das fontes de carbono alternativas sobre o crescimento celular, produção de ramnolipídios e PHAs pelos isolados de <i>P. aeruginosa</i> após 120 h de incubação.....	67
Tabela 7 Consumo da fonte de carbono por <i>P. aeruginosa</i> L2-1 crescendo em manipueira, glicerol, óleo de fritura e MOF.....	73
Tabela 8 Composição dos PHAs produzidos em glicerol pelas linhagens de <i>P. aeruginosa</i> estudadas após 72h de incubação.....	79
Tabela 9 Composição dos PHAs no substrato óleo de fritura produzido por todas as linhagens de <i>P. aeruginosa</i> estudadas após 72h de incubação.....	79
Tabela 10 Composição dos PHAs no substrato manipueira produzido por todas as linhagens de <i>P. aeruginosa</i> estudadas após 72h de incubação.....	80

Tabela 11 Composição dos PHAs produzidos através das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> crescendo no substrato MOF após 72h de incubação.....	80
Tabela 12 Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de <i>P. aeruginosa</i> L2-1 após 120 horas de incubação nos diferentes substratos.....	83
Tabela 13 Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de <i>P. aeruginosa</i> B1-3 após 120 h de incubação nos diferentes substratos.....	84
Tabela 14 Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de <i>P. aeruginosa</i> 6c após 120 h de incubação nos diferentes substratos.....	85
Tabela 15 Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de <i>P. aeruginosa</i> 7a após 120 h de incubação nos diferentes substratos.....	86
Tabela 16 Valores de tensão superficial (mN/m) dos ramnolipídios obtidos para todas as linhagens e substratos avaliados.....	89
Tabela 17 Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos da Jeneil Biosurfactant Company (JBR599) e do isolado <i>P. aeruginosa</i> L2-1 após 120 h de incubação no meio MOF e recuperação em coluna.....	91
Tabela 18 Valores de tensão superficial, interfacial e CMC das misturas de ramnolipídios da Jeneil Biosurfactant Company (JBR599) e do isolado L2-1.....	92
Tabela 19 Hidrofobicidade celular dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> (% de aderência ao hexadecano).....	106
Tabela 20 Concentração inibitória mínima 50% (MIC 50%) do ramnolipídio JBR599 e do ramnolipídio produzido pelo isolado L2-1.....	111

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Classificação e natureza química dos biossurfactantes.....	18
2.2 Ramnolipídios: estrutura e propriedades.....	22
2.3 Biossíntese de biossurfactantes.....	23
2.4 Produção a partir de substratos alternativos.....	24
2.4.1 Manipueira.....	24
2.5 Descoberta de novos biossurfactantes.....	26
2.6 Aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	27
2.6.1 Biorremediação.....	28
2.6.2 Emulsão e tensão interfacial.....	30
2.7 Função fisiológica dos biossurfactantes.....	31
2.7.1 Mobilidade.....	31
2.7.2 Formação de biofilmes.....	32
2.7.3 Acesso a substratos.....	33
2.8 Polihidroxialcanoatos (PHAs).....	33
2.8.1 Síntese e propriedades dos PHAs.....	35
2.8.2 Mercado e aplicações dos PHAs.....	36
2.9 Produção simultânea de ramnolipídios e PHAs.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Microrganismos.....	40
4.2 Locais de coleta para o isolamento de microrganismos.....	40
4.3 Meios de cultura e condições de cultivo.....	40
4.3.1 Isolamento de microrganismos do solo.....	40
4.3.2 Meio para isolamento seletivo de microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes.....	41

4.3.2.1 Teste de “Blue Agar”	41
4.3.2.2 Teste “King B. Medium”	41
4.3.2.3 Teste “Cálcio-Trioleína (CT)”	41
4.3.2.4 Teste “CFC suplemento seletivo”	42
4.4 Caracterização dos isolados	42
4.4.1 Teste de Gram	42
4.4.2 Sistema API 20NE	42
4.4.3 Outros métodos para a identificação dos microrganismos	43
4.5 Condições de cultivo	44
4.6 Meio de cultivo para teste de produção de biossurfactantes	44
4.6.1 Meio de cultivo salino adicionado com as fontes de carbono	44
4.6.2 Manipueira (M)	44
4.6.3 Manipueira suplementada com óleo de fritura (MOF)	45
4.7 Condições experimentais de produção	45
4.8 Análise dos resíduos	45
4.9 Determinação da biomassa (peso seco de células)	45
4.10 Determinação de polihidroxialcanoatos (PHAs)	46
4.11 Determinação de ramnolipídios	46
4.12 Determinação de glicerol, açúcar e óleo residual no meio de cultivo	47
4.13 Determinação da atividade lipolítica	47
4.14 Recuperação dos ramnolipídios e utilização como fonte de carbono para o cultivo celular	48
4.15 Recuperação dos ramnolipídios e estudo de suas propriedades e aplicações	48
4.16 Soluções de ramnolipídios	49
4.17 Propriedades	49
4.17.1 Tensão superficial e CMC	49
4.17.2 Tensão interfacial	50
4.17.3 Atividade emulsificante	50
4.18 Aplicações	50
4.18.1 Potencial para a remediação de ambientes contaminados	50
4.18.2 Simulação do efeito de exposição ao ambiente das amostras de areia contaminada por óleo por um determinado período de tempo	51
4.18.3 Aderência bacteriana a hidrocarbonetos	52

4.19 Toxicidade frente ao fenol.....	52
4.19.1 Incubação com compostos tóxicos.....	52
4.19.2 Toxicidade ao fenol.....	53
4.19.3 Adição de ramnolipídio.....	53
4.20 Atividade antimicrobiana.....	54
4.21 Análises estatísticas.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
CAPÍTULO 1.....	55
CAPÍTULO 2.....	66
CAPÍTULO 3.....	90
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
7. CONCLUSÕES.....	115
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	116
9. REFERÊNCIAS.....	117
10. ANEXO 1.....	135

1 - INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes constituem um grupo diverso de moléculas tenso-ativas sintetizadas por microrganismos cujas propriedades biológicas e superficiais podem ser aplicadas a vários processos industriais. A maior vantagem dos biossurfactantes quando comparado com os surfactantes sintéticos reside na sua diversidade estrutural (glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos, etc.), baixa toxicidade e biodegradabilidade podendo ser utilizados na fabricação de cosméticos, medicamentos e alimentos como agentes emulsificantes, umectantes, preservativos e detergentes. Outra vantagem é que podem ser produzidos a partir de vários substratos, como resíduos agro-industriais, contribuindo para a redução da poluição ambiental e permitindo agregar valor comercial nestes produtos.

Estima-se que em 2010, os biossurfactantes poderão atingir 10% do mercado dos surfactantes, alcançando US\$ 200 milhões em vendas sendo a área ambiental (biorremediação de hidrocarbonetos, poluentes orgânicos e metais pesados e tratamento e recuperação de óleo derramado) considerada como a mais promissora para uso destes compostos. (HESTER, 2001; O'CONNOR, 2002).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são caracterizadas pela sua versatiliade, sendo capazes de sintetizar uma grande quantidade de produtos de interesse industrial, como enzimas, piocianina, compostos tenso-ativos (ramnolipídios, viscosina), homoserina lactonas, exopolissacarídios e polímeros de estoque intracelular (polihidroxialcanoatos – PHAs). Os ramnolipídios representam uma das principais classes de biossurfactantes, os glicolipídios, compostos de carboidratos com longas cadeias alifáticas (SÓBERON-CHÁVEZ et al., 2005).

Os PHAs são inclusões citoplasmáticas, geralmente com um diâmetro de 0,2 – 0,5 μm , que atuam como reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. O alto número de monômeros e a variável composição da cadeia de PHAs resulta em uma enorme variedade de propriedades físicas e químicas, como por exemplo: elastômeros e termoplásticos. Os PHAs diferem dos polímeros quimiossintéticos, tais como polipropileno e polietileno, pela síntese a partir de fontes renováveis e por serem não tóxicos e de fácil biodegradabilidade. As diferentes propriedades permitem que os PHAs sejam utilizados em uma variedade de aplicações como a manufatura de embalagens, fabricação de próteses (indústria farmacéutica e médica) e como carreadores de aromatizantes para a indústria alimentícia.

Apesar das vantagens apresentadas, os biossurfactantes e PHAs não são amplamente utilizados pelas indústrias devido ao alto custo de produção, associados à baixa produtividade e ao uso de substratos caros. Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são conhecidas por sintetizarem simultaneamente ramnolipídios e PHAs. Os ramnolipídios são considerados como a classe de biotensoativos mais promissores em termos de produção industrial, pois apresentam características físico-químicas e biológicas distintas e podem ser obtidos em concentrações superiores aos outros biossurfactantes, o que contribui para a difusão do uso destas moléculas, especialmente em situações onde o benefício da aplicação supera os custos de produção. Já os PHAs podem ser utilizados na substituição dos polímeros derivados de petróleo.

O uso de fontes alternativas de nutrientes é uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento industrial da produção de ramnolipídios e PHAs. A seleção dos substratos envolve a dificuldade da razão (massa) entre carboidratos e lipídios e o suporte ótimo entre crescimento e produção dos metabólitos. Resíduos agro-industriais com altas quantidades de carboidratos ou lipídeos e resíduos urbanos têm sido utilizados como substratos na produção de ramnolipídios e PHAs (FERNÁNDEZ et al., 2005).

A manipueira é um resíduo líquido constituído pela água de extração da raiz de mandioca, cujo potencial poluidor é considerável, devido à grande concentração de material de origem orgânica não esgotada, sendo agravado, em função do grande volume gerado. O custo de tratamento das águas residuárias é elevado, sendo pouco viável para indústrias de médio e grande porte e totalmente inviável para pequenas indústrias, sendo de grande importância à busca de aplicações que transformem a manipueira em um subproduto de maior valor agregado (CEREDA, 1994). Considerando-se que a manipueira é rica em carboidratos e minerais esta poderia ser explorada como substrato para processos biotecnológicos. O uso da manipueira como um substrato alternativo para a produção de biossurfactante foi primeiramente descrito por Nitschke & Pastore (2003, 2004), utilizando *Bacillus subtilis*.

Outras fontes alternativas para a produção de biossurfactantes e PHAs são os óleos vegetais utilizados em frituras. No Brasil, há grande produção e consumo de óleos vegetais, principalmente óleo de soja, gerando elevados volumes de resíduos. De acordo com a SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) 1 litro de óleo pode chegar a contaminar 1 milhão de litros de água. Uma solução para tratamento dos resíduos de óleos vegetais seria a sua biotransformação. Estudos recentes têm demonstrado que estes

resíduos podem ser utilizados como substratos para a produção de ramnolipídios e PHAs (HABA et al. 2000; ABALOS et al. 2001; BENINCASA et al. 2002; NITSCHKE et al. 2005a; MARSUDI et al., 2008).

Um dos principais subprodutos obtidos da produção do biodiesel é o glicerol. Com a grande demanda de biodiesel devido a implantação da Lei Federal 11.097/2005, um dos problemas a ser resolvido é o destino do glicerol gerado. Já foi demonstrado que *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de sintetizar ramnolipídios utilizando glicerol (NITSCHKE et al, 2005a) embora em pequena quantidade se comparado a substratos hidrofóbicos. O uso do glicerol proveniente de plantas de biodiesel poderá ser mais uma alternativa a ser estudada.

O uso de técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas revelaram que os ramnolipídios produzidos em um meio de cultura consistem na verdade de uma mistura complexa de moléculas homólogas que diferem entre si pela composição química (DÉZIEL et al. 1999, 2000). Nitschke et al. (2005a) mostraram que a fonte de carbono influencia a distribuição dos homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI, sugerindo que a biossíntese pode ser direcionada de forma desejável pela simples seleção do substrato. É também conhecido que as propriedades dos ramnolipídios dependem da distribuição de seus homólogos, mas é pouco conhecida a contribuição individual de cada homólogo nas propriedades tenso-ativas.

A proposta de pesquisa na área de produção de ramnolipídios e PHAs a partir de resíduos é baseada no potencial de exploração comercial destes produtos, principalmente pelos níveis significativos de rendimento e ao seu uso diversificado, podendo ser usado na biorremediação, indústrias farmacêuticas, alimentícias e de química fina. Estes fatos aliados à baixa toxicidade, biodegradabilidade e propriedades tenso-ativas, tornam os ramnolipídios e PHAs compostos muito atrativos para a indústria e conseqüentemente sua demanda tende a ser crescente. O uso de substratos hidrofóbicos (óleos usados) e não hidrofóbicos (manipueira e glicerol) possibilitará a obtenção de diferentes homólogos de ramnolipídios e monômeros de PHAs com propriedades distintas, pois como se sabe, a fonte de carbono influi na distribuição destes diferentes homólogos e monômeros produzidos por *Pseudomonas spp.* Além disso, a produção a partir de resíduos agro-industriais contribui para a redução da poluição ambiental e permite a valorização comercial destes produtos.

Sendo assim, foi estudada a produção de biossurfactantes e PHAs a partir de substrato hidrofóbico (óleo usados) e dois substratos hidrofílicos: manipueira (açúcares) e glicerol

(álcool) para evidenciar a influência da natureza do substrato no tipo/composição dos ramnolipídios e PHAs sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa*.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia de hidrocarbonetos enquanto que a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica (DESAI & BANAT, 1997).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (como óleo/água e água/óleo). Quando um surfactante é adicionado em uma solução, as tensões interfacial e superficial decaem até certo nível da concentração do surfactante, o qual é conhecido por concentração micelar crítica (CMC). Ao se alcançar o valor da CMC, nenhuma redução da tensão é observada, mesmo com aumento da concentração de surfactante. Na CMC, os monômeros de surfactantes associam-se espontaneamente em estruturas agregadas, como micelas (diâmetro de 5nm), vesículas (diâmetro de 40 a 400 nm) e lamelas. Estes agregados são formados a partir de numerosas interações entre os grupos polares e não-polares, incluindo forças de van der Waals e ligação de hidrogênio. A CMC é dependente da estrutura do surfactante, pH, cadeia iônica e temperatura da solução (MAIER, 2003).

Estas propriedades tornam os biossurfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT, 2000).

2.1 - Classificação e natureza química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. Os microrganismos produtores se distribuem em diversos gêneros, sendo a maioria produzida por bactérias. As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

Os biossurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia de hidrocarbonetos 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 hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato. A maioria dos biossurfactantes é neutra, ou aniônica variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. A maior vantagem dos biossurfactantes quando comparados com os surfatantes sintéticos é sua maior aceitação ambiental, sua menor toxicidade e sua natureza biodegradável (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998; BOGNOLO, 1999). A Tabela 1 mostra os principais grupos de biossurfactantes produzidos.

Tabela 1

Principais tipos de biotensoativos e microrganismos produtores.

Biotensoativo	Microrganismo
Glicolipídios	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Burkholderia sp.</i>
Trealolipídios	<i>Rhodococcus erythopolis</i>
	<i>Nocardia erythopolis</i>
	<i>Mycobacterium sp</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i>
	<i>Torulopsis apicola</i>
	<i>Torulopsis petrophilum</i>
Clebliolipídios	<i>Ustilago zae</i>
	<i>Ustilago maydis</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
Peptidolipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Ácidos graxos, fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Anthrobacter calcoaceticus</i>

Os ramnolipídios de *Pseudomonas sp.* possuem um maior potencial de produção e utilização comparados aos outros biossurfactantes, apresentando baixa toxicidade ao ambiente e excelentes propriedades tenso-ativas e alta afinidade por moléculas orgânicas hidrofóbicas, além de poderem ser produzidos a partir de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos, como glicose, hidrocarbonetos e óleos vegetais (DESAI & BANAT, 1997).

2.2 - Ramnolipídios: estrutura e propriedades

Algumas espécies de *Pseudomonas* são capazes de produzir, sob certas condições, glicolipídios contendo ramnose, também chamados ramnolipídios. A produção destes compostos por *Pseudomonas aeruginosa* foi primeiramente descrita por Jarvis *et al* (1949).

Os dois principais homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* em cultura líquida são RhaC₁₀C₁₀ e RhaRhaC₁₀C₁₀. Todos estes compostos contêm um ou dois grupos de ramnose ligados a um ou dois ácidos graxos 3-hidroxi de diferentes comprimentos e que podem ser saturados ou insaturados (Figura 1) (NITSCHKE *et al.*, 2005b; SOBERÓN-CHÁVEZ, *et al.*, 2005). As várias combinações destes grupos geram uma grande quantidade de possíveis homólogos de ramnolipídios. Os métodos utilizados para o isolamento e análise química dos ramnolipídios envolvem uma separação cromatográfica das misturas em várias frações por cromatografia em camada delgada (CCD), frequentemente seguida por cromatografia líquida em alta eficiência (CLAF). Estas bandas semi-purificadas quando analisadas por espectrometria de massa permitem a caracterização das misturas de ramnolipídios (DÉZIEL *et al.*, 1999).

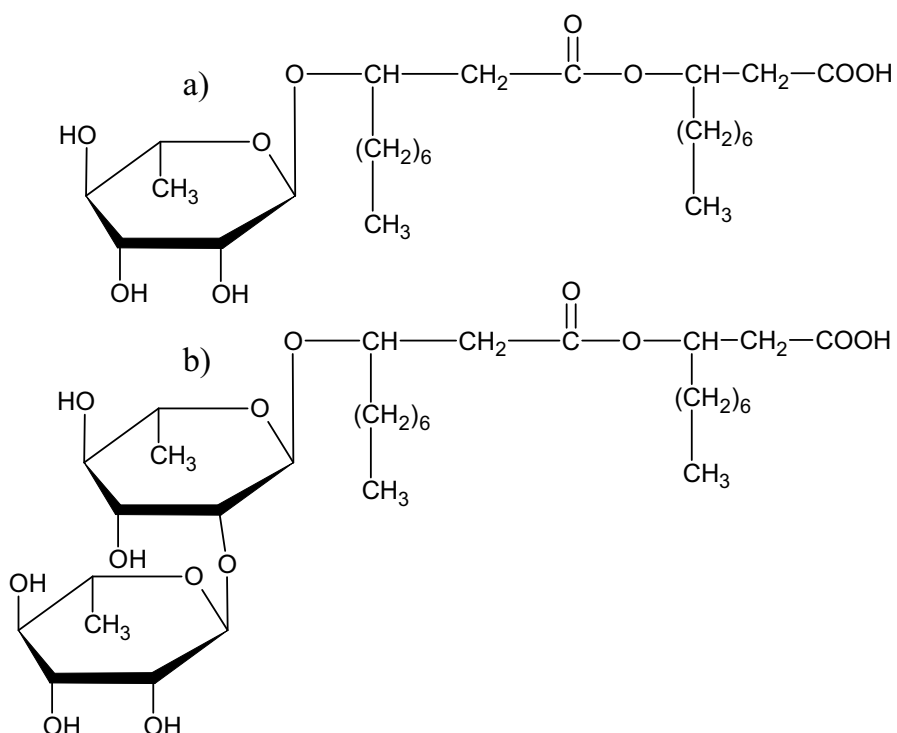


Figura 1 - Representação geral dos mono (a) e diramnoslipídios (b).

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

Os ramnoslipídios quando excretados no meio de cultura, reduzem a tensão superficial do meio para valores menores de 30 mN/m (MERCADÉ & MANRESA, 1994). A tensão superficial da água é reduzida de 72 para menos de 30 mN/m e a tensão interfacial em sistemas água/óleo de 43 para menos de 1mN/m. Ramnoslipídios também mostram a habilidade de emulsificar hidrocarbonetos e formar emulsões estáveis.

2.3 - Biossíntese de biossurfactantes

Para a produção em larga escala de metabólitos microbianos é necessário conhecer os mecanismos de regulação dos microrganismos escolhidos. Em geral, a produção de biossurfactantes pode ser induzida por hidrocarbonetos ou substratos insolúveis em água (NITSCHKE et al., 2005b).

Dependendo da natureza do biossurfactante e do microrganismo produtor, os seguintes padrões de produção destes compostos por fermentação são possíveis (DESAI & DESAI, 1993; SYLDATK & WAGNER, 1987):

- produção associada ao crescimento, onde existe uma relação paralela entre a utilização do substrato, crescimento e produção de biossurfatante;
- produção por células cultivadas em condições limitantes de crescimento, caracterizada por um aumento acentuado na produção de biotensoativos como resultado da limitação de um ou mais componentes do meio, como nitrogênio ou outros cátions multivalentes;
- produção por células não proliferantes, onde as mesmas são colhidas durante o estado de produção de biotensoativos e mantidas no mesmo meio, mas sem fonte de nitrogênio, assim elas não se multiplicam, porém continuam utilizando a fonte de carbono para a síntese destes compostos e
- adição de precursores como compostos lipofílicos e diferentes fontes de carbono.

Entretanto, seria difícil estabelecer um modelo padrão para a produção de biotensoativos, uma vez que estes compostos formam um grupo diverso, produzido por uma grande variedade de microrganismos. Desta forma, o desenvolvimento de processos fermentativos deve ser otimizado de acordo com cada caso (LIN, 1996).

Em geral, as diferentes fontes de carbono, a quantidade de íons e nitrogênio no meio, estratégias de fermentação, linhagem selecionada e outros fatores como pH, aeração, agitação e temperatura podem influenciar o tipo, a qualidade e a quantidade do ramnolipídio produzido. Todos estes fatores devem ser considerados no processo de produção de

ramnolipídios, necessitando de uma maior integração entre diferentes disciplinas e tecnologias (DELEU & PAQUOT, 2004).

2.4 - Produção a partir de substratos alternativos

O uso de substratos alternativos como: borra oleosa, óleos usados, glicerol, melão de cana, resíduos da produção de queijo, batata e mandioca, constitui uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento da produção industrial de biossurfactantes e PHAs, bem como redução dos custos de produção.

Ramnolipídios podem ser produzidos a partir de vários substratos. Óleos vegetais e resíduos do refino destes estão entre os substratos alternativos mais utilizados na produção de ramnolipídios, enquanto que fontes de carbono hidrofílicas, como glicose são menos exploradas (NITSCHKE et al., 2005b).

Nitschke et al. (2005a) estudaram diferentes resíduos de óleos vegetais (borra) de soja, algodão, milho, palma e babaçu, verificando a potencialidade destes como substrato na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI. A borra de soja foi o melhor substrato, gerando 11,7 g/L de ramnolipídios e um CMC de 51,5 mg/L. Costa et al., (2006) utilizaram óleos nativos do Brasil (Buriti, Cupuaçu, Maracujá, Andiroba, Castanha-do-Pará, e Babaçu) como fontes de carbono para *P. aeruginosa* LBI. As mais altas concentrações foram obtidas com óleos de castanha-do-Pará (9,9 g/L) e maracujá (9,2 g/L).

Óleos vegetais são excelentes substratos para a produção de PHAs porque a diferença na composição dos ácidos graxos dos óleos origina monômeros de PHA com composição variável. Marsudi et al., (2008) estudaram a utilização de óleo de palma na produção de PHAs por *P. aeruginosa* e obtiveram um produto com monômeros variando entre 6 a 14 carbonos, saturados e insaturados.

2.4.1 - Manipueira

Durante a fabricação da farinha de mandioca são gerados resíduos como a casca, o farelo e a manipueira, resíduo aquoso oriundo do processamento da raiz. O resíduo líquido gerado é na verdade uma mistura da água captada pela indústria com o líquido de constituição da raiz (manipueira) (DEL BIANCHI, 1998).

O potencial poluidor da manipueira é considerável devido à grande concentração de material orgânico não esgotado, sendo agravado em função do grande volume gerado. Além de poluente, o resíduo é tóxico pela presença de glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto, como a linamarina e a lataustralina (CEREDA, 1994).

Na Figura 2 é apresentado um fluxograma de uma fábrica de processamento de mandioca.

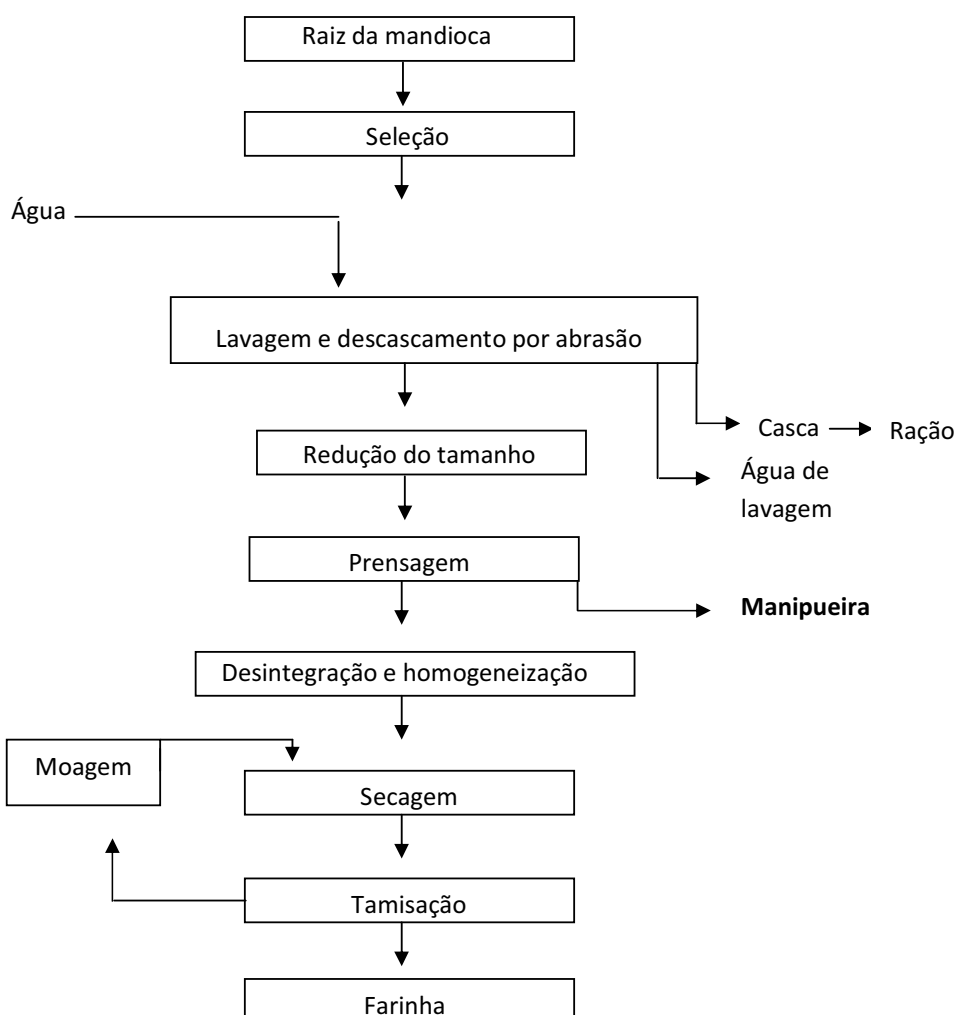


Figura 2 – Fluxograma de uma fábrica de processamento de mandioca.

A mandioca está entre os seis principais produtos agrícolas cultiváveis (trigo, arroz, milho, batata, aveia e mandioca) com uma produção estimada de 160 milhões de toneladas por ano (FAO, 2005). Considerando que durante a fabricação da farinha de mandioca geram-se aproximadamente 360 litros de manipueira por tonelada, o tratamento e os custos de descarte representam um enorme encargo econômico para a indústria farinheira bem como um problema ambiental, sendo necessário um melhor gerenciamento deste resíduo.

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca (12,7% do total). A produção nacional da cultura projetada pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para 2002 foi de 22,6 milhões de toneladas de raízes, numa área plantada de 1,7 milhões de hectares, com rendimento médio de 13,3 t/ha. Dentre os principais estados produtores destacam-se: Pará (17,9%), Bahia (16,7%), Paraná (14,5%), Rio Grande do Sul (5,6%) e Amazonas (4,3%), que respondem por 59% da produção do país (Dados: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa).

O uso da manipueira em processos biotecnológicos é uma alternativa viável que pode contribuir para a redução dos custos de produção dos biossurfactantes e também agregar valor ao resíduo. A manipueira têm sido usada na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* (NITSCHKE & PASTORE, 2006), óleos essenciais por *Fusarium oysporum* (MAROSTICA & PASTORE, 2007) e compostos voláteis por *Geotrichum fragans* (DAMASCENO et al., 2003).

2.5 - Descoberta de novos biossurfactantes

A grande diversidade microbiana sugere que apenas uma pequena fração dos biossurfactantes foi descoberta. E esta pode ser investigada por diferentes técnicas, como a caracterização metabólica e filogenética das bactérias que crescem em locais específicos, como por exemplo, locais impactados por hidrocarbonetos, auxiliando no conhecimento dos grupos de microrganismos que estão associados na biodegradação destes compostos.

A descoberta de novos biossurfactantes depende do avanço dos métodos analíticos e do esforço no isolamento de novas linhagens. Bodour et al (2003), isolaram microrganismos em diferentes amostras de solo (contaminadas por petróleo, metais pesados, petróleo mais

metais pesados e solos não contaminados) no sudoeste dos Estados Unidos (clima árido). Foram obtidas 1305 colônias, destas 45 foram capazes de produzir biossurfactantes, representando a maioria das amostras testadas. As relações filogenéticas foram determinadas por comparação do rRNA 16S, seqüência única de genes de cada isolado, revelando um novo microrganismo produtor de biossurfactante, uma *Flavobacterium sp.* Os autores concluíram que com um simples método de isolamento foi possível encontrar novos microrganismos produtores de biotensoativos.

Muitos autores (MUELLER et al, 1997; BODOUR et al, 2003; BENTO et al, 2005; VASILEVA-TONKOVA et al, 2006) isolaram novas linhagens produtoras de biossurfactantes em amostras contaminadas com hidrocarbonetos, mostrando que estes locais são indicativos para o isolamento de microrganismos produtores de biotensoativos.

2.6 - Aplicações comerciais dos biossurfactantes

Devido as propriedades dos biossurfactantes, estes podem ser usados em muitas aplicações incluindo remoção de óleo residual, na biorremediação, saúde pública e indústrias de processamento de alimentos e cosméticos (BANAT et al., 2000).

Os biossurfactantes podem ser usados como agentes anti-adesivos durante processo de fabricação de alimentos, particularmente na redução da contaminação por patógenos ou na remoção de microrganismos aderidos. A eficiência dos biossurfactantes produzidos por *P. fluorescens* e *Lactobacillus helveticus* em inibir a adesão de 4 linhagens de *Listeria sp.* em aço inox foi observado por Meylheuc et al (2006). A surfactina produzida por *Bacillus subtilis* promoveu uma redução no número de células de *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii* aderidas em aço inox, sendo que o resultado mais significativo foi obtido para *L. monocytogenes*, onde o log do número de células viáveis foi reduzido de 7 para 5, representando um decréscimo de 10^2 UFC/cm² (NITSCHKE et al., 2009).

Os biossurfactantes podem também ser utilizados no controle biológico, pois possuem ação bactericida, tendo ação no controle de patógenos causadores de doenças em vegetais (KIM et al, 2004).

Os biossurfactantes possuem uma variedade de aplicações nos bioprocessos microbiológicos, promovendo aumento na produção de produtos extracelulares através da interação dos componentes da membrana celular. Biossurfactantes específicos com estruturas coloidais facilitam a transferência do oxigênio durante a fermentação e podem ser usados na separação de sistemas celulares (SINGH et al, 2007).

Em saúde pública, os biossurfactantes possuem aplicações terapêuticas, estes incluem os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* e surfactina produzido por *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* como antibióticos (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002). Indústrias de cosméticos e de medicamentos utilizam biossurfactantes como agentes emulsionantes e solubilizadores. Repelentes de insetos, pasta dental, produtos anticaspa e desodorantes são alguns exemplos de produtos que incluem surfactantes em suas fórmulas (MAYER & SOBERÓN-CHAVEZ, 2000).

Biossurfactantes podem ser efetivos na desorção de contaminantes do solo, auxiliando nos processos de biorremediação e recuperação de aquíferos. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e alcanos podem ser removidos de solos contaminados a partir da adição de ramnolipídios (DEAN et al, 2001, STRAUB et al, 2003). Ramnolipídios também são capazes de remover metais pesados do solo como Ni e Cd devido a sua natureza aniônica, com eficiências de 80-100% (MULLIGAN et al., 2001). Os resíduos de glutamato presentes na surfactina produzida por *B. subtilis* podem ligar-se a metais como, Mg, Mn, Ca, Ba, Li e Rb (THIMON et al, 1992).

2.6.1 - Biorremediação

As principais causas dos danos ambientais promovidos por compostos orgânicos de origem petrolífera são oriundas de derramamentos acidentais ou algumas vezes ao descarte intencional de óleo ou resíduos oleosos na água ou no solo, ocorrendo normalmente através da corrosão nos encanamentos e bombas, levando a vazamentos, e no derramamento durante o transporte. O derramamento de óleo ou o seu descarte na água eventualmente leva ao solo. Sendo assim, a solução ideal seria prevenir os derramamentos ou descartes, mas nem sempre isso é possível (URUM et al., 2006).

O acúmulo e persistência de materiais tóxicos na água e no solo representam atualmente um grande problema. Vários subprodutos orgânicos são gerados a partir de diferentes indústrias (petrolíferas, petroquímicas, papel, químicas) os quais são naturalmente liberados ou acidentalmente derramados no ambiente. A maioria dos compostos encontrados é tóxico, mutagênico e/ou carcinogênico e esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de novas tecnologias de remediação e para a descontaminação de solos (URUM et al., 2003).

Várias tecnologias estão disponíveis atualmente para o tratamento de solos contaminados por derivados de petróleo, incluindo escavação e armazenamento em locais apropriados, extração à vapor, estabilização e solidificação, lavagem do solo, extração por solventes, desorção termal, vitrificação, incineração e a biorremediação (RUSSEL, 1992). Em algumas destas metodologias, como a biorremediação, fitorremediação e incineração, há uma transformação e/ou destruição completa destes contaminantes (normalmente em CO_2 e H_2O), sendo necessário um grande período de tempo para serem efetivadas e não sendo economicamente viáveis quando há grandes volumes de material contaminante. Já a técnica de lavagem do solo permite uma separação e extração dos contaminantes do solo, sem mudança química do mesmo, é economicamente viável, relativamente rápida, possui potencial em tratar e recuperar grandes volumes de contaminantes e a sua utilização previne a formação de produtos nocivos que podem ser produzidos durante o processo de remediação (URUM et al., 2006).

A aplicação de surfactantes para a lavagem de solos tem sido estudada (MULLIGAN et al., 2001; PASTEWSKY et al., 2006) e estes estudos indicaram que a remoção do óleo usando uma solução de surfactante ocorre abaixo e acima da concentração micelar crítica (CMC) do mesmo. Dois mecanismos são propostos para a remoção do óleo no solo pelo surfactante. O mecanismo de mobilização ocorre abaixo do valor da CMC devido a baixa tensão interfacial entre a água e o óleo, levando a redução da força capilar entre o óleo e o solo. Já a solubilização ocorre no valor da CMC ou acima desta, onde o surfactante se encontra aglomerado, com o início da formação de agregados, conhecidos como micelas (MULLIGAN et al., 2001).

Biossurfactantes têm sido testados na recuperação e tratamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, sendo bastante efetivos na diminuição da tensão interfacial do óleo e da água e na viscosidade do óleo. O Emulsan[®] tem sido comercializado para este propósito e

contêm polissacarídeos unidos por ácidos graxos e proteínas, sendo produzida pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* (ROSENBERG & ROSENBERG et al., 1981).

Os ramnolipídios têm sido utilizados em lavagem de solos contaminados por hidrocarbonetos demonstrando uma remoção três vezes maior do que água pura, sendo este teste realizado em areia contaminada após o derramamento de óleo no navio Exxon Valdez, Alasca, EUA (HARVEY et al., 1990). Pastewsky et al., (2006) mostraram que a solubilização do tetracloroetileno e do diclorobenzeno foi mais efetiva em soluções de ramnolipídio (JBR 425) do que em soluções de Triton X-100[®] e Rokanol L10[®], chegando a conclusão de que o uso deste biossurfactante na remediação do solo, onde a solubilização micelar é dominante, pode ser interessante. Os biossurfactantes: ramnolipídio, saponina, escina, lecitina e o surfactante sintético SDS (dodecil sulfato de sódio) foram testados na remoção de óleo em solo (URUM et al., 2003). Os autores concluíram que as soluções de SDS, saponina e ramnolipídio removeram mais que 79% do óleo contido na areia (URUM et al., 2003). Santa Anna et al., (2007) utilizaram ramnolipídios constituídos no meio de cultivo isento de células, resultante do cultivo de uma cepa de *P. aeruginosa*, no processo de remediação de solos arenosos impactados por derrames de óleo. Os autores concluíram que a ação dos biossurfactantes foi similar à de biossurfactantes comerciais concentrados. Apesar de existirem relatos na literatura (SANTA ANNA et al., 2007), o uso de biossurfactantes na lavagem de solos contaminados por óleos ainda é limitada.

2.6.2 - Emulsão e tensão interfacial

Acima do valor da CMC, os monômeros de surfactantes tendem a se agregar para formar as micelas. Muitos sistemas permanecem inalterados no valor da CMC até que a adição de surfactante cause a formação das micelas aumentando a sua atividade aquosa (URUM & PEKDEMIR, 2004). Dependendo das propriedades do sistema, a configuração da micela pode ser esférica, alongada, cilíndrica, em forma de lamelas ou de vesículas.

A formação das micelas é de grande importância para o entendimento das microemulsões. Microemulsões são emulsões termodinamicamente estáveis contendo domínios de água e óleo separados por um filme de surfactante. As microemulsões são usadas em diversas aplicações como, na recuperação melhorada do petróleo, no carreamento de

medicamentos e na remediação de aquíferos. Uma das habilidades das microemulsões é formarem baixas tensões interfaciais (DESAI & BANAT, 1997; ACOSTA et al, 2002).

Na remediação de solos, os líquidos que não estão aderidos na fase aquosa estão presos entre os poros do solo por forças capilares causadas pela alta tensão interfacial entre óleo-água. Micelas podem auxiliar na solubilidade do contaminação (solubilização), mas este não é tão eficiente quanto a mobilização, processo onde ocorre a formação das microemulsões com uma drástica redução na tensão interfacial e consequente desprendimento do óleo na superfície (CHILDS et al., 2005). Portanto, a redução da tensão interfacial entre óleo-água é de suma importância para que a remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos ocorra de forma eficiente.

2.7 - Função fisiológica dos biossurfactantes

Apesar dos biossurfactantes terem sido extensivamente estudados quanto as suas aplicações comerciais, a sua função fisiológica ainda é especulativa e pouco conhecida. Os biotensoativos são importantes para a mobilidade, interações célula-célula, diferenciação celular, acesso ao substrato e expulsão de compostos tóxicos da célula (SÓBERON-CHÁVEZ et al, 2005).

2.7.1 - Mobilidade

A mobilidade é um processo fisiológico essencial nos microrganismos, permitindo a colonização de novos ambientes e continuação do crescimento e reprodução, sendo relevante na formação dos biofilmes e patogenicidade. Esta ocorre via processo mecânico, como a rotação flagelar, ou por deslizamento via movimento friccional das proteínas de membrana sobre uma superfície. Quando os microrganismos se encontram em interfaces os biossurfactantes podem ser secretados para reduzir a tensão interfacial e facilitar o movimento. Este é o caso da natação, uma forma organizada de translocação, onde

populações de microrganismos migram em grupos (SÓBERON-CHÁVEZ et al, 2005; VAN HAMME et al, 2006).

P. aeruginosa podem colonizar superfícies por natação, necessitando da produção de agentes que reduzem a tensão superficial. Déziel et al (2003) observaram que os ácidos 3-(3-hidroxicanoiloxi) alcanóico (HAAs), precursores dos ramnolipídios, também atuam como biossurfactantes e podem auxiliar na natação quando há ausência de ramnolipídios. Caiazza et al (2005) também sugeriram que os HAAs afetam a hidrofobicidade celular. Estes exemplos mostram que a redução da tensão superficial causada pela ação dos biossurfactantes, auxilia na mobilidade dos microrganismos.

2.7.2 - Formação de biofilmes

Os biofilmes, complexos ecossistemas microbianos, podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. Desta maneira, os biofilmes são definidos como associações de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies (DAVEY et al., 2003).

Os biossurfactantes são capazes de manter abertos os canais do biofilme pela alteração das interações célula-célula e a fixação da bactéria nas superfícies. A síntese induzida dos ramnolipídios durante os últimos estágios de desenvolvimento do biofilme implica na ativação de um mecanismo onde a bactéria aproveita as interações intercelulares para manter estes canais, ou seja, os ramnolipídios participam da manutenção da arquitetura dos biofilmes (DAVEY et al, 2003). Boles et al (2005) relataram que os ramnolipídios de *P. aeruginosa* são essenciais para a separação das células do centro dos biofilmes, conhecido como separação central da cavidade. A adição de ramnolipídio exógeno ou dodecil-sulfato de sódio (SDS) também induziu a separação central das células em biofilmes, auxiliando na manutenção da estrutura destes.

2.7.3 - Acesso a substratos

Um dos principais papéis dos biossurfactantes é auxiliar a interação dos microrganismos com os compostos orgânicos hidrofóbicos, pois facilitam ao acesso a substratos pouco solúveis ou possibilitam o seu transporte para dentro da célula. Os microrganismos podem entrar em contato com um substrato via contato direto com cristais e gotas (óleo cru em água) ou pela pseudosolubilização do substrato em micelas e emulsão. Via contato direto, a hidrofobicidade das superfícies celular e do substrato pode inviabilizar as interações, e os biossurfactantes podem favorecê-las (VAN HAMME et al, 2006).

Há dois mecanismos no quais os biossurfactantes podem auxiliar na biodegradação de compostos orgânicos (petróleo e seus derivados). Primeiro, eles podem solubilizar os compostos hidrofóbicos formando as micelas, o que aumenta a solubilidade do composto e a sua acessibilidade pela célula e segundo, podem deixar a superfície celular mais hidrofóbica, aumentando a associação da célula com o substrato (AL-TAHHAN et al, 2000). Por exemplo, Zhang & Miller (1994) descreveram que o ramnolipídio não apenas torna mais solúvel os hidrocarbonetos, mas também modifica a superfície celular, resultando no aumento da hidrofobicidade celular.

2.8 - Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Polihidroxialcanoatos (PHAs) formam uma classe de poliésteres naturais podendo ser acumulados por diversos microrganismos sob a forma de grânulos intracelulares e representando até 80% do peso seco de células. A função mais freqüentemente atribuída a estes grânulos é a de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (SUDESH et al., 2000). Cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHA produzidos por bactérias a partir de diversas fontes de carbono. Os monômeros de PHAs podem ser divididos em dois grupos, o primeiro são os de cadeia curta (PHA_{sc}) contendo 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e o segundo grupo são os monômeros de cadeia média (PHA_{mc}) contendo 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal. O mais estudado

PHA é o poli-3-hidroxi-3-butirato (PHB), um polímero de 3-hidroxi-3-butirato o qual é classificado como um hidroxialcanoato de cadeia curta (MADISON & HUISMAN et al., 1999).

PHA_{scl} são encontrados em bactérias pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos e os PHA_{mcl} só foram detectados em *Pseudomonas* do grupo I de homologia do RNA ribossomal. Uma das características importantes desse grupo é a sua incapacidade em produzir PHB, ou seja, são incapazes de sintetizar PHA_{scl} (SUDESH et al. 2000). A Figura 3 mostra a representação geral dos PHAs.

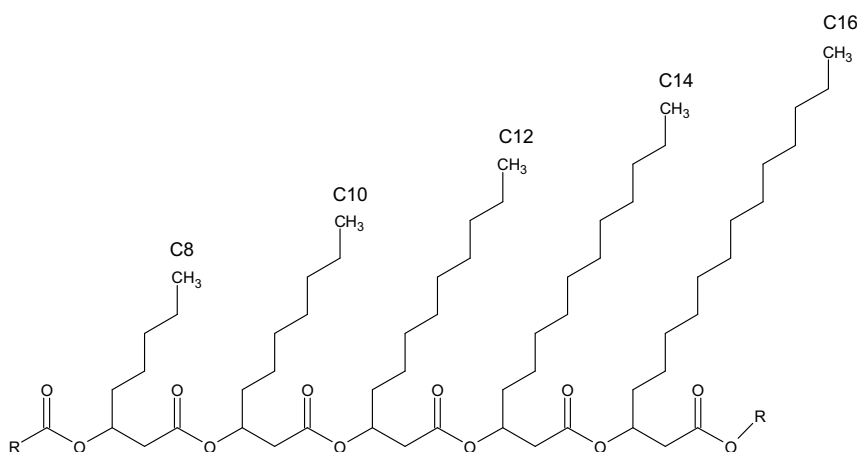


Figura 3 - Representação geral dos PHAs.

A maioria das bactérias do gênero *Pseudomonas* é capaz de produzir polihidroxi-3-alcenoatos não apenas quando elas são cultivadas em alcanos alifáticos ou ácidos graxos, mas também a partir de glicose e outras fontes de carbono. Por exemplo, *P. putida* quando cultivada em ácido octanóico como fonte de carbono, acumula um co-poliéster consistindo de C_{8:0} e C_{12:0} como o principal e maior constituinte, respectivamente. Entretanto, quando glicose é a fonte de carbono um co-poliéster consistindo principalmente de C_{10:0} é produzido enquanto que C_{8:0} e C_{12:0} são acumulados minoritariamente. Esta capacidade implica que o metabolismo dos ácidos graxos dessa bactéria (biossíntese *de novo* e β -oxidação) está ligado com a biossíntese de PHAs (STEINBUCHER & LUTKE-EVERSLOH, 2003).

2.8.1 - Síntese e propriedades dos PHAs

A síntese de PHA em *Pseudomonas* é dividida em duas rotas e é dependente da fonte de carbono fornecida. A primeira é conhecida como “biotransformação biossinteticamente dirigida” em que a composição do polímero produzido está estruturalmente relacionada ao substrato fornecido. Os substratos dessa via metabólica podem ser hidrocarbonetos, álcoois e ácidos carboxílicos. A segunda é conhecida como “biotransformação xenobiótica” e ocorre quando os microrganismos são cultivados em açúcares, acetato e glicerol onde o substrato é metabolizado a acetil-CoA produzindo um polímero contendo C_{10:0} como principal constituinte e C_{8:0} e C_{12:0} como constituintes secundários (MADISON & HUISMAN et al., 1999).

A biossíntese de ramnolipídios é dependente das vias metabólicas centrais, como a dos ácidos graxos, e está intimamente relacionada à produção de PHAs, o qual possui passos biossintéticos em comum (SÓBERON-CHÁVEZ et al., 2005).

Óleos vegetais e carboidratos têm se mostrado excelentes fontes de carbono para a produção de PHAs com a presença de frações saturadas e insaturadas, porém o grau de insaturação dos polímeros produzidos não pode ser controlado (SUDESH et al., 2000). Entretanto, Silva-Queiroz et al., (2009) utilizaram espécies de *Pseudomonas* e óleos vegetais como fonte de carbono para a produção de PHAs_{MCL}. Os autores verificaram que é possível controlar a biossíntese de PHAs de acordo com a composição do óleo utilizado, permitindo gerar monômeros com composições semelhantes a partir de óleos vegetais com diferentes composições de ácidos graxo. Quando misturas de ácidos alifáticos saturados e insaturados foram usados como fontes de carbono, uma relação entre a fonte de carbono insaturada e a fração insaturada dos PHAs produzidos foi encontrada (HARTMANN et al., 2006). As PHA sintases são as enzimas chave da biossíntese de PHA, que catalizam a polimerização dos ácidos hidroxialcanóicos (HAS) em PHAs (REHM & STEINBUCHER, 1999).

O alto número de monômeros e diferente composição monomérica dos PHAs resulta em uma enorme variação de características físicas e químicas. Eles são termoplásticos e/ou elastômeros, insolúveis em água, enantiômeros, não tóxicos e exibem um alto grau de polimerização e massa molar de alguns milhões de Da (STEINBUCHER & LUTKE-EVERSLOH, 2003). PHAs diferem dos polímeros quimiossintéticos, tais como polipropileno

e polietileno, pela síntese a partir de fontes renováveis e sua fácil biodegradabilidade. As diferentes propriedades permitem que os PHAs sejam utilizados em uma variedade de aplicações como a manufatura de embalagens, fabricação de próteses (indústria farmacêutica e médica) e como carreadores de aromatizantes para a indústria alimentícia (MADISON & HUISMAN et al., 1999).

2.8.2 - Mercado e aplicações dos PHAs

O mercado e o desenvolvimento de bioplásticos ainda são muito pequenos se comparado aos plásticos derivados do petróleo. A biodegradabilidade e a compatibilidade ambiental dos bioplásticos ainda não são motivos que justificam a substituição dos plásticos convencionais pelos bioplásticos. O principal entrave para a popularização dos bioplásticos está relacionado com os custos de produção, sendo que os plásticos convencionais são manufaturados com um custo menor. As poliolefinas, como polietileno e polipropileno, possuem um custo menor que US\$ 1/Kg, já a produção dos bioplásticos está estimada em US\$ 3 – 4/Kg, sendo vendidos por um preço cerca de 5 -10 vezes maiores do que os plásticos sintéticos (Suriyamongkol et al., 2007). Sendo assim, diferentes estratégias de fermentação com o isolamento de novos microrganismos produtores de bioplásticos e o uso de fontes de carbono alternativas, como resíduos agroindustriais, contribuem para a redução dos custos de produção e conseqüentemente aumentariam a viabilidade econômica dos bioplásticos.

A produção mundial de PHAs em 2008 foi de 49,5 mil toneladas, representando uma série de vantagens ambientais, como a substituição do petróleo, diminuição da emissão de gases efeito estufa e por serem facilmente biodegradáveis (ORTS et al., 2008).

PHAs tem sido utilizados para a fabricação de filmes biodegradáveis com o propósito de serem utilizados na agricultura. Podem ser utilizados como uma camada protetora para fertilizantes, herbicidas e inseticidas (HOCKING et al., 1994). Também podem ser utilizados para a fabricação de materiais osteossintéticos, como próteses e suturas cirúrgicas e na engenharia de tecidos, como suporte de crescimento celular (WILLIANS et al., 1999). Mas uma das principais aplicações dos PHAs e suas blendas está na área de embalagens, podendo substituir os plásticos derivados de petróleo, isso porque eles são compatíveis com muito alimentos, como produtos lácteos, bebidas e produtos cárneos (SORRENTINO et al., 2007).

2.9 - Produção simultânea de ramnolipídios e PHAs

A produção simultânea de PHAs e ramnolipídios é importante para a redução dos custos de produção de ambos os produtos. Os PHAs são encontrados no interior da célula bacteriana, portanto para a sua recuperação é necessário uma quebra da membrana e parede celular com consequente liberação do PHA, sendo que este processo é bastante representativo para o custo de produção durante a fermentação. A produção de materiais secretados como os ramnolipídios, em combinação com a produção de PHAs, representa um aumento na viabilidade dos processos de biocatálise, porque as células podem ser usadas para a produção de materiais secretados antes da recuperação final dos PHAs, e técnicas convencionais como a centrifugação podem ser usadas para a separação dos dois produtos (HORI et al., 2002; MARSUDI et al., 2008).

Apesar dos ramnolipídios e PHAs serem bem estudados, a produção simultânea destes produtos a partir de um mesmo substrato e microrganismo ainda é pouco conhecido. São poucos os trabalhos que relatam a produção simultânea de PHAs e ramnolipídios de *P. aeruginosa*. Hori et al., (2002) estudaram a viabilidade da produção simultânea de PHAs e ramnolipídios por *P. aeruginosa* em decanoato, etanol e glicose como fontes de carbono. Decanoato foi a fonte de carbono mais apropriada e PHAs e ramnolipídios foram produzidos após a fase de crescimento. O tipo da fonte de carbono afetou a composição dos monômeros de PHAs.

Óleo de palma foi utilizado como substrato para a produção simultânea de ramnolipídios e PHAs por *P. aeruginosa* IFO3924 (MARSUDI et al., 2008). Após o consumo total da fonte de nitrogênio e fase de crescimento, iniciou-se a produção de ambos os produtos (PHA e ramnolipídio). O acúmulo final de PHAs foi de 36% em massa seca, com a composição monomérica variando de 8 a 14 carbonos. Os autores concluíram que os ácidos graxos resultantes da hidrólise do óleo favoreceram o crescimento celular e produção de PHAs via β -oxidação e os ramnolipídios foram sintetizados a partir da via síntese *de novo* dos ácidos graxos. Pham et al., (2004) estudaram o papel da biossíntese de PHA na produção de ramnolipídios e alginato usando mutantes de *P. aeruginosa* deficientes em PHAs. A PHA sintase não está diretamente envolvida com a biossíntese de ramnolipídios, mas a biossíntese de PHAs e alginato estão em competição com um precursor em comum.

Sendo assim, a tomada de algumas medidas como, o uso de substratos alternativos, a otimização da eficiência da biossíntese e a melhora dos parâmetros de cultivo, podem contribuir para a ampliação do uso de ambos os produtos e conseqüentemente com a redução dos custos de produção. A síntese de ramnolipídios e PHAs estão relacionadas, pois em ambas as vias são utilizados os derivados da síntese de ácidos graxos como substratos (Figura 4).

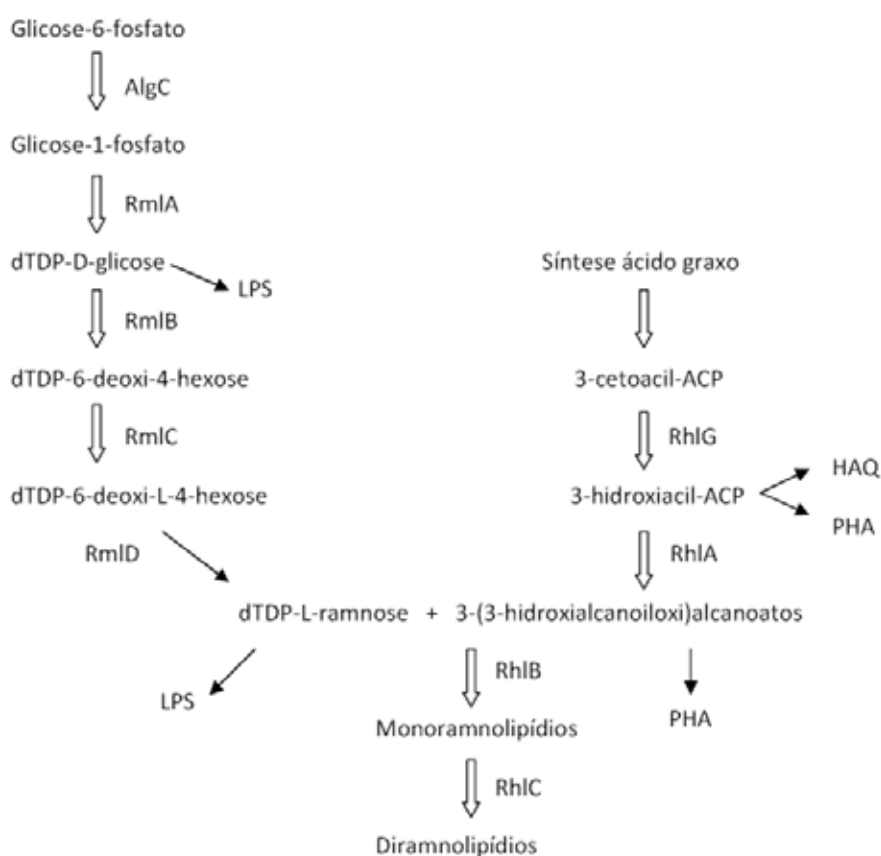


Figura 4 – Rota metabólica de produção dos ramnolipídios (SOBERON-CHAVEZ et al., 2005).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Geral

- Estudar a produção de biossurfactantes e PHAs de *Pseudomonas sp.* a partir de substratos não convencionais.

3.2 - Específicos

- Verificar a potencialidade das cepas isoladas com relação aos substratos propostos assim como verificar novos produtores potenciais;
- Isolar e selecionar linhagens de *Pseudomonas spp.* com capacidade para sintetizar ramnolipídios e PHAs a partir dos substratos propostos;
- Avaliar a potencialidade do uso de manipueira, óleos vegetais e glicerol para a produção de ramnolipídios e PHAs;
- Caracterizar os biossurfactantes e PHAs obtidos quanto a sua composição química e propriedades físico-químicas;
- Relacionar a composição química com as propriedades dos compostos obtidos;
- Estabelecer relação entre a natureza da fonte de carbono e a distribuição das moléculas homólogas presentes no produto;
- Investigar possíveis aplicações.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Microrganismos

Foram utilizadas *Pseudomonas aeruginosa* LMI 6c e *Pseudomonas aeruginosa* LMI 7a previamente selecionadas por sua capacidade de produzir ramnolipídios a partir de resíduos oleosos (COSTA et al., 2008), além de outros microrganismos isolados a partir de solos contaminados com hidrocarbonetos.

4.2 - Locais de coleta para o isolamento de microrganismos

Os locais de coleta para o isolamento dos microrganismos foram:

- 1) Refinaria do Planalto Paulista (REPLAN), localizada na cidade de Paulínia, SP, rodovia SP 332, km 132. Foi coletado solo de “landfarming” em diferentes locais. Os microrganismos isolados neste local receberam as terminações LMI-A, LMI-B e LMI-L.
- 2) Praia Guaecá e região do rio Guaecá em São Sebastião, SP. Os microrganismos isolados neste local receberam a terminação LMI-SB.

As amostras de solo coletadas foram guardadas em frascos estéreis e mantidas em geladeira até o isolamento dos microrganismos.

4.3 - Meios de cultura e condições de cultivo

4.3.1 - Isolamento de microrganismos do solo

A partir de amostras de solos contaminados com óleos foram isoladas diferentes bactérias visando obtenção de potenciais produtores de ramnolipídios. Inicialmente, 10 g de solo foram diluídos em 50 ml de água destilada estéril. Desta suspensão, 1 ml foi transferido para frasco de Erlenmeyer de 50 ml contendo 20 ml, de meio constituído por 3 g/L de extrato de carne e 5 g/L de peptona (caldo nutriente). O frasco foi incubado em mesa agitadora a 30 °C e 200 rpm por 24 horas. Após este período, alíquotas de 0,1 ml do meio foram transferidas para placas de Petri contendo ágar nutriente e incubadas em estufa a 30°C.

As colônias isoladas obtidas foram transferidas para meios seletivos específicos e submetidas a caracterização morfológica e bioquímica descritos nos itens a seguir.

4.3.2 - Meio para isolamento seletivo de microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes

4.3.2.1 - Teste de “Blue Agar”

Para detecção de glicolipídios extracelulares foi utilizado o teste de “Blue Agar” descrito por Siegmund *et al.* (1991). A fonte de carbono foi modificada, utilizou-se glicerol e mantendo a concentração final. Os microrganismos positivos a este teste exibem um halo mais intenso que o meio, indicando a produção de glicolipídios extracelulares.

4.3.2.2 - Teste “King B. Medium”

O teste de “King B. Medium” (KING et al. 1954) foi usado para a detecção da produção de pigmentos e crescimento de culturas de *Pseudomonas spp.* A ausência do elemento ferro estimula a produção de pigmentos.

4.3.2.3 - Teste “Cálcio-Trioleína (CT)”

O teste “cálcio-trioleína” (WOLHFARTH & WINKLER, 1988) foi usado para distinguir colônias capazes de produzir lipase. Os microrganismos positivos a este teste exibem cristais brancos em cima da colônia, indicando a formação de oleato de cálcio.

4.3.2.4 - Teste “CFC suplemento seletivo”

O teste “CFC suplemento” (MEAD & ADAMS, 1977) é recomendado para *Pseudomonas spp.* O uso da ceftriaxona combinada com a fucidina e cefaloridina (CFC) propiciam um meio específico para isolamento de *Pseudomonas spp.*

4.4 - Caracterização dos isolados

Os isolados foram identificados através de métodos morfológicos, microbiológicos e bioquímicos, seguindo as direções da última edição do Manual de Bergey's (BERGEY'S MANUAL, 1994).

4.4.1 - Teste de Gram

Em uma lâmina de vidro fez-se um esfregaço de células do microrganismo a ser estudado. O esfregaço seco foi fixado com uma solução de cristal de violeta, que permaneceu sobre a lâmina por um minuto. Depois de esgotada, a lâmina foi coberta por solução de lugol por mais um minuto e foi lavada com álcool 95%, gota a gota, até que não houvesse mais liberação de corante. Lavou-se a lâmina com água corrente sendo a mesma posteriormente coberta com solução de safranina por 30 segundos e novamente lavada em água corrente e seca. A análise foi realizada em microscópio óptico.

4.4.2 - Sistema API 20NE

O API 20NE (Biomérieux – Marcy-I’Etoile/France) é um sistema padronizado de identificação de bacilos Gram-negativos não enterobactérias (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc) que combina 8 testes enzimáticos convencionais e 12 testes de assimilação de carboidratos.

Cada isolado foi inoculado em 0,85% NaCl e a turbidez foi ajustada para o padrão 0,5 de MacFarland. Os inóculos foram distribuídos nos poços de teste e foram incubados a 30°C por 24 e 48 horas. As reações foram lidas como positivas ou negativas; passadas para perfis numéricos e interpretados por um software (APILAB Plus update 3.3.3). Como microrganismo padrão utilizou-se *P. aeruginosa* 6c e 7a isoladas em locais contaminadas por hidrocarbonetos (COSTA et al., 2008).

4.4.3 - Outros métodos para a identificação dos microrganismos

Para bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, realizou-se o teste de oxidase. Bactérias do gênero *Bacillus spp.* são oxidase positiva, já os outros gêneros Gram-positivos formadores de esporos são oxidase negativos (BERGEY’S MANUAL, 1994).

A identificação dos microrganismos foi confirmada por análise filogenética baseado na sequência do RNA ribossomal 16S.

4.5 - Condições de cultivo

Os microrganismos foram estocados em caldo nutriente contendo 50% de glicerol a -79°C. Inoculou-se um tubo contendo TSA (trypticase soy agar) incubando-se a 30°C por 24 horas e a massa celular foi retirada com auxílio de alça adicionando-se 3 mL de uma solução salina estéril. A densidade óptica (610nm) da suspensão de cada isolado foi determinada e delimitada para faixa de 0,65 a 0,7 (10^8 ufc/mL) e 1 mL da suspensão padronizada foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio mineral e 2% de óleo de soja como fonte de carbono, incubando-se em mesa agitadora tipo “shaker” à 200 rpm, 30

°C por 24 horas. Após este período, 1 mL do meio foi utilizado como inóculo para os ensaios de produção de ramnolipídio.

4.6 - Meio de cultivo para teste de produção de biosurfactantes e PHAs

Quatro diferentes meios foram preparados para o cultivo utilizando os diferentes resíduos (manipueira, óleo vegetal usado e glicerol). O óleo de fritura foi coletado em restaurantes e indústrias alimentícias em Rio Claro, SP. O glicerol foi obtido em planta de produção de biodiesel localizada na cidade de Piracicaba, SP.

4.6.1 - Meio de cultivo salino adicionado com as fontes de carbono

O meio de cultivo utilizado foi o meio salino descrito por Robert et al. (1989) e composto por (g/L): NaNO_3 , 4,0; K_2HPO_4 , 1,0; KH_2PO_4 , 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; KCL, 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; CaCl_2 , 0,01; extrato de levedura, 0,01 e 0,05 mL/L e de uma solução de elementos traços contendo: boro (0,026%), cobre (0,05%), manganês (0,05%), molibdênio (0,006%) e zinco (0,07%). O pH inicial do meio foi ajustado com HCl 1 M e NaOH 1M para 6,8-6,9. As fontes de carbono foram óleo de fritura e glicerol, adicionado na concentração 2%.

4.6.2 - Manipueira (M)

A manipueira foi coletada na Indústria Plaza S/A, localizada na cidade de Santa Maria da Serra, SP e estocada à -18°C , sendo utilizada em todos os experimentos. Os sólidos foram removidos após aquecimento, e posterior esfriamento por centrifugação a 5000g por 10 minutos (Nitschke & Pastore, 2006). O sobrenadante livre de sólidos foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e usado como meio de crescimento, o sobrenadante foi distribuído em frascos. O pH foi ajustado para 6,8-6,9.

4.6.3 - Manipueira suplementada com óleo de fritura (MOF)

O meio MOF foi preparado com a manipueira sem a presença de resíduos sólidos (como descrito no item 6.6.2) e suplementado com 2% de óleo usado. O pH da manipueira foi ajustado para 6,8-6,9.

Todo o material utilizado nos ensaios fermentativos foi esterilizado em autoclave a 121⁰C e 1 atm por 20 minutos.

4.7 - Condições experimentais de produção

O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio. Estes foram inoculados com 1 mL de inóculo (conforme descrito no item 4.5) e incubados por 120 horas, 200 rpm e 30 °C, sendo que foram retiradas amostras a cada 24 horas. As análises foram realizadas em duplicata.

4.8 - Análise dos resíduos

As características físico-químicas da manipueira foram realizadas no Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT) localizada na Fazenda Experimental Lageado, UNESP – Botucatu.

A composição de ácidos graxos na amostra de óleo foi realizado no Laboratório de Óleos e Gorduras, localizado na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, utilizando cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 6850 series GC System).

4.9 - Determinação da biomassa (peso seco de células)

Em intervalos de tempo definidos, frascos foram retirados (25 mL) para análise da biomassa, tensão superficial e concentração de ramnolipídios. Duas porções de 10 mL foram centrifugadas, e as células foram coletadas e lavadas com água destilada. Uma amostra foi ressuspendida em água destilada, secando-se a 80°C por 24 horas e o peso seco foi determinado gravimetricamente. As células contidas na outra amostra foram congeladas e liofilizadas “overnight” para posterior análise de polihidroxicarboxilatos (PHAs). O sobrenadante foi usado para a quantificação e análise de ramnolipídios, esterase, lipase e medidas da tensão superficial. As análises foram realizadas em duplicata

4.10 - Determinação de polihidroxicarboxilatos (PHAs)

Os PHAs foram determinados pela metodologia da metanólise ácida (Brandl et al., 1989). Aproximadamente 5 mg de células liofilizadas foram adicionadas à 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de H₂SO₄ e aquecidos à 100 °C por 160 minutos. Após este processo, 0,5 mL de água destilada foram adicionados e o tubo foi agitado vigorosamente por 1 minuto. A fase orgânica foi coletada e à mesma foi adicionado sulfato de sódio para a remoção completa da água. Uma alíquota de 100 µL da amostra foi tratada com 25 µL de BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamida) (Supelco- USA) por 3 horas a 70 °C. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS) usando um Thermo Scientific Trace GC Ultra interfaciado a um Polaris Q MS e equipado com uma coluna Thermo TR-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) no modo de ionização química (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). O modo de ionização química utilizou metano como gás ionizante. Após injeção à 60 °C, a temperatura do forno foi aumentada 4 °C por minuto até atingir 240 °C, e esta temperatura foi mantida por 12 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram 230 e 240 °C, respectivamente. Hélio foi usado como gás carreador a um fluxo de 0,6 mL por minuto.

4.11 - Determinação de ramnolipídios

O caldo celular (após cada 24 horas de fermentação) foi centrifugado a 15000g por 10 minutos para remoção das células. No sobrenadante foi adicionado o ácido 16-hidroxihexadecanóico, em uma concentração final de 10 ppm, como padrão. Todas as análises foram realizadas pela metodologia de HPLC/MS utilizando um espectrômetro de massa quadrupolo triplo Quatro II (Micromass, Manchester, UK)” e utilizando ionização por eletrospray em modo negativo (ESI-MS). O aparelho foi interfaciado a um HP 1100 HPLC (Agilent, Technologies) equipado com uma coluna de fase reversa Zorbax C₈ 150 x 4 mm (DÉZIEL et al., 1999).

4.12 - Deteminação de glicerol, açúcar e óleo residual no meio de cultivo

O óleo residual foi mensurado usando 5 mL do meio de cultivo misturado com 5 mL de hexano e centrifugado a 7500g à 15 °C por 15 minutos. Após centrifugação, 3 mL da fase superior, contendo hexano e óleo, foram transferidos (micropipeta) para um frasco tarado (vidro). Estes foram levados para uma estufa a 100°C por 24 horas, para que o hexano fosse evaporado. O conteúdo de óleo foi determinado pela diferença do peso inicial (Pi) e do peso final (Pf) do frasco.

Os açúcares presentes na manipueira (frutose, glicose e maltose) e o glicerol presente no meio de cultivo salino foram quantificados por HPLC usando um SP Thermo Separation e coluna REZEX ROA (Phenomenex) e detectados por índice de refração. Uma solução 0,005 M de ácido sulfúrico foi usada como solvente a um fluxo de 0,4 mL/min a 60°C. As amostras foram identificadas por comparação pelo tempo de retenção com os padrões de glicerol e dos respectivos açúcares.

4.13 - Determinação da atividade lipolítica

As atividades das enzimas lipase e esterase no sobrenadante livre de células foram determinadas pelo método de Kilcawley et al., (2002). Uma solução contendo 0,15 mL NaCl e 0,5% Triton X-100 em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) foi pré-incubada à 37 °C. Para 1,8

mL desta solução, 200 μ L de uma diluição de aproximadamente 100 vezes do sobrenadante e 20 μ L de uma solução 50 mM do substrato em acetonitrila (*p*-nitrofenol butirato para esterase e *p*-nitrofenol palmitato para lipase) foram adicionados e incubados a 40 °C por 30 minutos. O total de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado foi determinado à 400 nm e a atividade foi expressa em unidades, onde uma unidade é definida como o total de enzima capaz de liberar 1 nmol de *p*NP sobre condições padrões.

Também foi preparado meio sólido para a detecção de atividade da lipase (meio lipase-tributirina), contendo (g/L): peptona de carne (2,5); caseína (2,5); extrato de levedura (3,0); agar (12); tributirina (10 mL); Tween 80 (100 μ L); 1%.de vermelho fenol (solução 0,8%). O Tween 80 e o vermelho fenol foram adicionados assepticamente após autoclavagem.

4.14 - Recuperação dos ramnolipídios e utilização como fonte de carbono para o cultivo celular

Após o término da fermentação o meio foi centrifugado a 10000 g para a separação das células. O sobrenadante foi acidificado a pH 2,0 com H₂SO₄ 6N. Igual volume de CHCl₃/CH₃OH (2:1) foi adicionado ao sobrenadante em um funil de separação e agitado por 10 minutos. Houve a formação de duas fases e a fase orgânica foi retirada. Repetiu-se a operação, e os volumes retirados foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo a vácuo (45°C). O produto obtido foi adicionado no meio de cultivo, em uma concentração final de 2%, como única fonte de carbono com o objetivo de se verificar se o ramnolipídio pode ser usado como fonte energética.

4.15 - Recuperação dos ramnolipídios e estudo de suas propriedades e aplicações

O meio de cultivo foi centrifugado para remoção das células e o sobrenadante foi acidificado a pH 2,0 com H₂SO₄ concentrado deixando-se em geladeira por aproximadamente 12 horas. O precipitado obtido foi separado por centrifugação e dissolvido em água destilada. A solução de ramnolipídios foi alcalinizada para pH 6,1 e separada por cromatografia de

adsorção (ABALOS *et al*, 2001). A coluna vidro foi preparada com resina Amberlite XAD[®] (Supelco). Inicialmente a coluna foi lavada com água destilada e posteriormente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,1. A solução contendo os tensoativos foi adicionada com fluxo de aproximadamente 1,0 mL/minuto. A saída da coluna foi controlada pela medida de tensão superficial. Quando o valor de tensão era menor que 35mN/m (indicando que a coluna estava saturada) procedeu-se a lavagem da mesma com água destilada até que a tensão superficial de saída fosse semelhante a da água (72mN/m). Os ramnolipídios retidos na coluna foram recuperados pela adição de metanol a um fluxo de aproximadamente 1,0 mL/minuto. As amostras foram coletadas em béquer e as alíquotas contendo o extrato metanólico (amareladas e sem resíduos de água) foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo à vácuo (45°C). O produto resultante contendo os ramnolipídios apresentou-se como um líquido viscoso e amarelo-esverdeado, que foi guardado em geladeira.

4.16 - Soluções de ramnolipídios

O produto obtido durante a recuperação dos ramnolipídios foi dissolvido em água destilada na concentração micelar crítica (CMC) e acima desta. Foi também utilizado o ramnolipídio comercial JBR599 produzido pela Jeneil Biosurfactant Company, Saukville, EUA. As soluções foram utilizadas para a caracterização físico-química, propriedades biológicas e aplicações descritas a seguir.

4.17 – Propriedades

4.17.1 - Tensão superficial e CMC

O monitoramento da tensão superficial foi determinada segundo o método do anel de De Nöuy (ZAJIC & SEFFENS, 1984) utilizando-se um tensiômetro Krüss K6. A concentração micelar crítica (CMC) foi determinada medindo-se a tensão superficial de uma

série de diluições da solução do surfactante extraído. A concentração total de surfactante foi determinada por HPLC-MS como descrito no item 4.10.

4.17.2 - Tensão interfacial

Soluções aquosas na CMC dos ramnolipídios foram medidas contra hexadecano.

4.17.3 - Atividade emulsificante

Em um tubo de ensaio com tampa rosca adicionou-se 2 ml de solução aquosa contendo os tensoativos (na concentração da CMC, e CMC mais 1 e 5% em massa de ramnolipídio) e 2 mL do composto hidrofóbico a ser estudado: benzeno, querosene e óleo de soja. O tubo foi fechado e agitado vigorosamente em agitador vortex por 2 minutos, deixando-se a solução em repouso por 24 h. A atividade emulsificante (E24) foi calculada como: (altura da camada emulsionada / altura total de líquido) x 100 (IQBAL *et al*, 1995). Também foi avaliada a estabilidade das emulsões formadas após 30 dias.

4.18 – Aplicações

4.18.1 - Potencial para a remediação de ambientes contaminados

Á 10 g de areia adicionou-se 1 g de petróleo de baixa viscosidade, misturando-se bem. O conjunto areia-óleo ficou 7 dias em temperatura ambiente para que houvesse uma maior adesão do óleo na areia. Porções de 5 g da areia contaminada foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL, adicionadas de 20 mL da solução de ramnolipídios (na concentração da CMC, e CMC mais 0,1, 1 e 5% em massa de ramnolipídio), e levadas para agitador (shaker) por 20 minutos a 200 rpm e 30 °C. Após a retirada da solução aquosa (primeira

lavagem), adicionou-se novamente 20 mL de solução surfactante repetindo-se a lavagem por mais 20 minutos. O líquido da segunda lavagem foi removido e o óleo resultante foi retirado por lavagens seguidas de solvente (diclorometano). Como controle, também se realizou lavagem com água destilada. O solvente foi colocado em béquers, previamente pesados, deixando-se secar em estufa 50 °C. Após evaporação do solvente, os béquers foram novamente pesados para medir a porcentagem de remoção de óleo, que seguiu a seguinte fórmula:

$$\% = (P_i - P_f) / P_i \times 100$$

onde: P_i = peso inicial do béquer com remoção total do óleo por solvente;

P_f = peso final do béquer com o óleo resultante das lavagens com biotensoativos.

Para se calcular o peso inicial (P_i) o conjunto areia mais óleo bruto não foi lavado com a solução de ramnolipídio, o óleo foi retirado por lavagens seguidas de solvente (diclorometano) até sua retirada total. O solvente foi colocado em béquers, previamente pesados, deixando-se secar em estufa 50 °C. Após evaporação do solvente, os béquers foram novamente pesados para medir a porcentagem total de óleo na areia. Os ensaios foram realizados em triplicata (URUM *et al.* 2004 – modificado).

4.18.2 - Simulação do efeito de exposição ao ambiente das amostras de areia contaminada por óleo por um determinado período de tempo

Este estudo foi realizado com o intuito de se analisar o efeito da exposição ao ambiente das amostras de areia contaminada por um determinado período de tempo, por exemplo, em casos de acidentes que envolvem derramamento de óleo ou quando há locais contaminados por um longo período de tempo que necessitam de remediação (URUM *et al.*, 2004). Amostras da areia contaminada foram incubadas a 50 °C por 14 dias e a perda de massa foi avaliada através da diferença de peso. O método de lavagem foi realizado de acordo com o item 4.17.1.

4.18.3 - Aderência bacteriana a hidrocarbonetos

A hidrofobicidade celular foi mensurada de acordo com o teste de “aderência microbiana à hidrocarbonetos” (MATH – sigla em inglês) (ROSENBERG et al., 1980). As células a serem testadas foram lavadas para remover qualquer interferência de possíveis solutos e ressuspensas em uma solução tampão (pH 7,0) contendo 16,9 g de K_2HPO_4 , 7,3 g de KH_2PO_4 , 1,8 g de ureia e 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro. A densidade óptica (D.O.) desta solução foi ajustada para aproximadamente 1,0 (400 nm). Uma alíquota da suspensão celular (4,0 mL) e uma alíquota de hexadecano (1,0 mL) foram misturados em tubo de ensaio com tampa de rosca, que foi agitado vigorosamente em agitador vortex por 1 minuto. Após agitação, o tubo ficou em repouso por 30 minutos para que ocorresse a separação entre a suspensão celular e o hexadecano. A fase aquosa foi cuidadosamente removida com uma pipeta Pasteur e sua D.O. foi medida a 400 nm. A hidrofobicidade foi mensurada como a porcentagem de aderência ao hexadecano, o qual é calculado como: $(DO \text{ da fase aquosa} / DO \text{ da suspensão celular}) \times 100$.

O efeito do ramnolípido na aderência celular ao hexadecano também foi determinado. Para este experimento, as células foram lavadas e ressuspensas como descrito anteriormente e várias concentrações de ramnolípido (0,01 a 0,1 g/L) foram adicionadas nas suspensões celulares, procedendo ao teste MATH.

4.19 - Toxicidade frente ao fenol

4.19.1 - Incubação com compostos tóxicos

P. aeruginosa L2-1 foi inoculada em um tubo contendo ágar-nutriente e incubada à 30°C por 24 horas. A massa celular foi retirada com auxílio de alça adicionando-se 3 mL de uma solução salina estéril. A densidade óptica (610nm) da suspensão de cada isolado foi determinada e delimitada para faixa de 0,65 a 0,7 (10^8 ufc/mL) e 1 mL da suspensão padronizada foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio

mineral (ROBERT et al., 1989) e 2% de glicerol como fonte de carbono, incubando-se em mesa agitadora tipo “shaker” à 200 rpm, 30°C por 7 horas. Após 4 horas de incubação, diferentes concentrações de fenol foram adicionadas. A concentração do fenol nos frascos a serem incubados foi ajustada a partir de uma solução estoque de fenol (1 M). O crescimento celular foi monitorado por 7 horas retirando-se alíquotas a cada hora. A contagem do número total de células foi realizada a partir do número de células viáveis em placas de Petri com ágar-nutriente, a partir de uma diluição seriada. As placas foram mantidas à 30 °C por 24 horas antes de se iniciar a contagem. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.19.2 - Toxicidade ao fenol

A toxicidade ao fenol foi quantificada pela concentração efetiva 50% (E50%), definida como concentração que causa 50% de inibição do crescimento bacteriano (HEIPIEPER et al., 1995). A inibição do crescimento causado pelo fenol foi avaliada pela comparação nas diferenças das taxas de crescimento (μ) entre a cultura com fenol (μ_1) e a cultura controle (μ_2). A inibição no crescimento nas diferentes concentrações de fenol foi determinada como sendo a porcentagem da taxa de crescimento entre as culturas intoxicadas com fenol e o controle, pela seguinte equação:

$$\text{Inibição no crescimento (\%)} = (\mu_1/\mu_2) \times 100$$

4.19.3 - Adição de ramnolipídio

Ramnolipídio foi adicionado no meio de cultivo em uma concentração final de 300 mg/L, nas culturas controle e com fenol, com o intuito de se verificar a influência deste na E50%.

4.20 - Atividade antimicrobiana

Foram realizados testes para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos compostos frente a bactérias utilizando-se a técnica de microdiluição em placa (Woods & Washington, 1995). Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella enterica* ATCC13076, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* ATCC4698, *Rhodococcus equi* ATCC6938, *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004.

Para os testes utilizou-se o meio Muller-Hinton. A partir de culturas estoque foram inoculadas placas/tubos com os respectivos meios de cultura incubando-se por 24 h a 37°C. Colônias isoladas foram selecionadas e diluídas em 5 mL de solução NaCl 0,86%. A turbidez desta solução foi comparada com padrão 0,5 da escala McFarland (correspondente 10^8 ufc/mL).

As amostras de ramnolipídios a serem estudadas foram preparadas na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ em meio de cultivo e distribuídas através de diluições sucessivas em microplacas de 96 cavidades. Cada cavidade da placa foi primeiramente adicionada de 100 μL de caldo de cultivo sendo que 100 μL de amostra contendo biossurfactante foram adicionados as 8 cavidades da primeira coluna (1) ficando a concentração igual a 512 $\mu\text{g/mL}$. Após homogeneização com pipeta, 100 μL da amostra da coluna 1 foram transferidas para coluna 2 (256 $\mu\text{g/mL}$) e assim sucessivamente até a coluna 10. As colunas 11 e 12 da placa foram usadas como controle positivo e negativo do crescimento microbiano. As culturas padronizadas foram adicionadas (5 μL) em cada cavidade correspondente e as microplacas foram fechadas e incubadas nas temperaturas citadas acima. Após o período de incubação o valor da densidade óptica foi estimado por avaliação em leitora de microplacas (Thermoplate) em 592 nm.

4.21 – Análises estatísticas

Os tratamentos foram comparados pela média e desvio padrão usando o software Origin 8.0 (Origin Lab Corp., Northampton, MA). Todos os dados são médias de pelo menos duas réplicas independentes.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 1 – Análise dos resíduos, isolamento e seleção dos microrganismos produtores de ramnolipídios.

5.1 - Análise dos resíduos

5.1.1 - Análise da composição físico-química da manipueira

A manipueira é o resíduo líquido constituído pela água de extração de fécula de mandioca e é composto pela mistura da água captada pela indústria com o líquido da constituição da raiz. Esta se caracteriza por conter a maioria das substâncias solúveis, e algumas insolúveis em suspensão. O volume gerado em média por tonelada de raiz gira em torno de 3,68 m³ (CEREDA, 1994). Na Tabela 2 é apresentada a composição da manipueira coletada e utilizada neste trabalho. Nota-se pela tabela abaixo que a manipueira contém fontes de carbono, nitrogênio e diversos sais minerais que tornam este resíduo passível de ser aproveitado para o cultivo de microrganismos.

Tabela 2

Características físico-químicas da manipueira utilizada neste trabalho.

Componentes	Concentração
Proteína (%)	0,96
Glicose (g/L)	24,55
Frutose (g/L)	30,05
Maltose (g/L)	1,81
Nitrato (g/L)	0,71
Nitrito (mg/L)	0,05
Fósforo (g/L)	0,90
Potássio (g/L)	3,96
Magnésio (g/L)	0,55
Sódio (mg/L)	23,00
Ferro (mg/L)	6,00
Zinco (mg/L)	11,00
Manganês (mg/L)	4,00
Cobre (mg/L)	14,00

A manipueira possui glicosídeos que podem hidrolisar liberando cianeto, como a linamarina e a lotaustralina que podem se constituir como fontes tóxicas para o crescimento de microrganismos. Nos microrganismos o cianeto interfere na fosforilação oxidativa combinando-se com o citocromo oxidase e inibindo o transporte eletrônico, e conseqüentemente, a formação de ATP. Porém, com o aquecimento da manipueira até a fervura para a remoção de sólidos e a esterilização do material em autoclave, ocorre a desestabilização destes glicosídeos e o possível efeito tóxico é eliminado (CEREDA, 1994).

A Figura 4 mostra a prensagem da mandioca e a coleta da manipueira.



Figura 4 – Prensagem da mandioca e coleta da água de manipueira (A = prensagem; B = coleta).

5.1.2 - Análise de ácidos graxos do óleo de fritura

As mudanças físicas que ocorrem no óleo ou gordura durante o processo de fritura incluem: escurecimento, aumento da viscosidade, diminuição do ponto de fumaça e formação de espuma. As alterações químicas podem ser resumidas em três diferentes reações: os óleos podem hidrolisar para formar ácidos graxos livres (monoacilglicerol e diacilglicerol) ou podem oxidar para formar peróxidos, hidroperóxidos, drenos conjugados, epóxidos, hidróxidos e cetonas e/ou podem se decompor em pequenos fragmentos ou permanecer na molécula do triacilglicerol e se associarem, conduzindo a triacilgliceróis diméricos e poliméricos (SANIBAL & FILHO, 1999).

Na Tabela 3 é apresentada a composição do óleo de soja, utilizado no trabalho, após processo de fritura. Nota-se que o ácido linoléico (C18:2) se apresenta como ácido graxo majoritário com 42,99%, seguido do ácido oléico (C18:1) com 30,15%, ácido palmítico (C16) com 14,83%, ácido esteárico (C18) com 4,51% e ácido linolênico (C18:3) com 3,72%. Outros ácidos graxos foram detectados em porcentagem menor que 1%. O total de ácidos graxos saturados é de 20,15% e de insaturados é de 79,85%.

Tabela 3

Composição de ácidos graxos (%) p/p do óleo de fritura utilizado no trabalho

Ácido graxo		(%) p/p
C10:0	Cáprico	0,03
C12:0	Láurico	0,03
C14:0	Mirístico	0,47
C16:0	Palmítico	14,83
C16:1	Palmitoléico	0,67
C18:0	Estearico	4,51
C18:1 Trans	Elaídico	0,97
C18:1	Oléico	30,15
C18:2 Trans	Linoelaídico	0,35
C18:2	Linoléico	42,99
C18:3 Trans	Tanslinolênico	0,71
C18:3	Linolênico	3,72
C20:0	Araquídico	0,15
C20:1	Gadoléico	0,27
C22:0	Behênico	0,13

5.1.3 - Isolamento e seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes

A escolha dos locais para a coleta de material para o isolamento de novos microrganismos produtores de biossurfactantes baseou-se em amostras contaminadas por

hidrocarbonetos, pois estes locais são indicativos para o isolamento de microrganismos produtores de biotensoativos. Os locais de coleta foram: 1) refinaria do Planalto Paulista (REPLAN), localizada na cidade de Paulínia, SP, onde foi coletada terra de “landfarming”; e 2) praia Guaecá e região do rio Guaecá em São Sebastião, SP. Este local foi atingido por um vazamento de petróleo que ocorreu em fevereiro de 2004, na faixa de dutos que liga o Tebar (Terminal Marítimo Almirante Barroso) de São Sebastião à refinaria Presidente Bernardes, em Cubatão (SP), atingindo cerca de 8 km do rio Guaecá, situado no Parque Estadual da Serra do Mar.

A técnica de isolamento utilizada neste trabalho propiciou um total de 21 culturas bacterianas, que passaram pelos testes bioquímicos de identificação, e ensaios de produção de ramnolipídios. A Tabela 4 mostra a distribuição e identificação das bactérias isoladas a partir das amostras contaminadas. Não foi possível a caracterização dos microrganismos L2-2 e A2-2 (bastonetes Gram -) pelo sistema API 20NE, pois os resultados indicaram “fraca discriminação e perfil inaceitável”. Já as bactérias L1-1, L1-4, L2-3, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A2-3 e B1-4 não fazem parte da base de dados do API 20NE (bacilos Gram + e cocos Gram + e -). Para os bacilos Gram + formadores de esporos, realizou-se o teste de oxidase. Bactérias do gênero *Bacillus spp.* são oxidase positiva, já os outros gêneros Gram + formadores de esporos são oxidase negativos. O teste de oxidase foi positivo para os microrganismos estudados, confirmando o gênero *Bacillus sp.* Já a diferenciação para espécie deste gênero é difícil devido ao grande número de espécies e a freqüente descrição incompleta de novas espécies reportadas (Bergey’s Manual, 1994). Como padrão para o sistema API 20 NE utilizaram-se os microrganismos LMI-6c e LMI-7a, isoladas anteriormente (COSTA et al., 2008) e identificadas como *P. aeruginosa*.

Tabela 4

Distribuição das bactérias isoladas a partir das amostras contaminadas e suas respectivas caracterizações (gram, morfologia e identificação a partir de testes bioquímicos).

Microrganismos (LMI)	Gram	Morfologia	Identificação
L1-1	+	Bastonete com esporos	<i>Bacillus sp.</i>
L1-2	-	Bastonete longo	<i>Acinetobacter sp.</i>
L1-3	-	Bastonete	<i>Chryseobacterium sp.</i>
L1-4	+	Bastonete com esporos	<i>Bacillus sp.</i>
L2-1	-	Bastonete curto	<i>Pseudomonas sp.</i>
L2-2	-	Bastonete	NI*
L2-3	+	Bastonete com esporos	<i>Bacillus sp.</i>
L3-1	-	Bastonete	<i>Aeromonas sp.</i>
L3-2	-	Bastonete	<i>Shewanella sp.</i>
L3-3	-	Bastonete	<i>Chryseobacterium sp.</i>
A1-1	+	Cocos	NI
A1-2	+	Bastonete com esporos	<i>Bacillus sp.</i>
A2-1	+	Bastonete com esporos	<i>Bacillus sp.</i>
A2-2	-	Bastonete	NI
A2-3	-	Cocos	NI
B1-1	-	Bastonete	<i>Shewanella sp.</i>
B1-3	-	Bastonete	<i>Pseudomonas sp.</i>
B1-4	+	Bastonete com esporos	<i>Bacillus sp.</i>
SB-1	-	Bastonete	<i>Burkholderia sp.</i>
SB-2	-	Bastonete	<i>Burkholderia sp.</i>
SB-3	-	Bastonete	<i>Burkholderia sp.</i>

NI* - não identificado

Bacillus foi o gênero mais frequentemente encontrado (6 espécies), seguido de *Burkholderia* (3), *Pseudomonas* (2), *Chryseobacterium* (2), *Shewanella* (2), *Acinetobacter* (1) e *Aeromonas* (1). A biota reflete as bactérias heterotróficas típicas encontradas em solos e os gêneros associados à biodegradação de hidrocarbonetos. A maioria dos isolados encontrados são bastonetes Gram – (61%), seguidos de bacilos Gram + formadores de esporos (33%) e cocos Gram + e – (6% do total). Bodour et al (2003) isolaram uma série de microrganismos produtores de biossurfactantes em diferentes amostras de solo e constataram que as bactérias Gram – dominam os locais contaminados por hidrocarbonetos e as bactérias Gram + dominam os locais contaminados por metais pesados, o que pode representar a habilidade dos microrganismos em sobreviver nestes locais ou pode ser uma resposta ao tipo de contaminante. A maioria dos isolados no presente trabalho são bactérias Gram –, e este predomínio está de acordo com o descrito anteriormente.

A adição de hidrocarbonetos em um ecossistema, resultado de um derramamento de óleo, pode seletivamente aumentar ou diminuir o tamanho da população microbiana, sendo dependente da composição química do contaminante e as espécies de microrganismos presentes no ecossistema. Este evento pode primariamente aumentar o número de microrganismos capazes de utilizar os hidrocarbonetos e secundariamente aumentar o número de microrganismos capazes de utilizar os metabólitos produzidos. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* são bactérias normalmente relatadas em trabalhos que descrevem a diversidade microbiana de locais que sofreram impacto por derramamento de derivados de petróleo (MERCADÉ et al, 1996; MUELLER et al, 1997; HABA et al, 2000; RAHMAN et al, 2003, BODOUR et al, 2003; BENTO et al, 2005; VASILEVA-TONKOVA et al, 2006).

5.1.4 - Ensaio para a produção de biossurfactantes

As bactérias isoladas foram estudadas para verificar a habilidade destas de crescer no meio de cultivo salino utilizando óleo usado e glicerol como fontes de carbono. Apenas 6 dos 21 microrganismos isolados apresentaram turbidez no meio de cultivo, representando crescimento celular positivo. Destes, cinco (5) diminuíram a tensão superficial do meio para menos de 40 mN/m, indicando diretamente a atividade superficial dos biossurfactantes. Os

valores mais baixos de tensão superficial foram alcançados por: *Pseudomonas sp.* L2-1 31,8 mN/m, *Pseudomonas sp.* B1-3 31,5 mN/m, *Burkholderia sp.* SB-1 31,9 mN/m, *Burkholderia sp.* SB-2 31,6 mN/m e *Burkholderia sp.* SB-3 38,0 mN/m, tendo óleo usado como substrato (Tabela 5).

Tabela 5

Ensaio da produção de biossurfactantes nos diferentes isolados através da medida de tensão superficial e crescimento celular.

Substrato	Glicerol			Óleo usado			
	Microrganismos	T.S. (mN/m)*	pH	Crescimento celular [#]	T.S. (mN/m)*	pH	Crescimento celular [#]
L1-1		66,2	6,80	-	53,5	6,90	-
L1-2		54,0	7,34	+	52,5	6,96	-
L1-3		58,8	6,13	-	52,5	6,92	-
L1-4		63,0	6,33	-	52,3	6,93	-
L2-1		<u>35,4</u>	8,95	+	<u>31,8</u>	6,47	+
L2-2		64,1	6,80	-	52,0	6,91	-
L2-3		67,8	6,80	-	54,0	6,65	-
L3-1		61,1	6,42	-	54,1	6,94	-
L3-2		67,4	5,30	-	53,3	6,90	-
L3-3		63,0	6,31	-	55,5	6,94	-
A1-1		67,6	7,00	-	53,5	6,80	-
A1-2		67,9	6,62	-	46,2	6,93	-
A2-1		64,0	6,75	-	53,5	6,90	-
A2-2		68,5	6,47	-	51,0	6,94	-
A2-3		69,7	7,01	-	45,0	8,64	-
B1-1		69,0	6,88	-	53,0	6,93	-
B1-3		<u>35,0</u>	8,95	+	<u>31,5</u>	6,54	+
B1-4		70,0	6,82	-	46,4	6,83	-
SB-1		55,2	9,19	+	<u>31,9</u>	8,15	+
SB-2		60,4	8,75	+	<u>31,6</u>	7,25	+
SB-3		55,0	6,99	+	<u>38,0</u>	5,76	+

*Tensão superficial; # (+) positivo, (-) negativo.

Os microrganismos *Pseudomonas* L2-1 e B1-3 e *Burkholderia* SB-1, SB-2 e SB-3 foram submetidos aos testes de detecção de colônias produtoras de lipase (“Cálcio-trioleína”), detecção da produção de pigmentos (“King B. Medium”) e glicolipídios extracelulares (“Blue-Agar”).

Em todas as colônias houve a formação dos cristais de cálcio-trioleína, indicando a produção de lipase e conseqüente consumo de óleo usado como substrato. No teste de “King B. Medium”, apenas nos isolados *Pseudomonas* L2-1 e B1-3 houve a formação de pigmentos, tornando o meio de cultura mais esverdeado. Para estes dois microrganismos também houve a formação de um halo mais intenso que o meio, indicando a produção de glicolipídios extracelulares no meio “Blue Agar”. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 5.

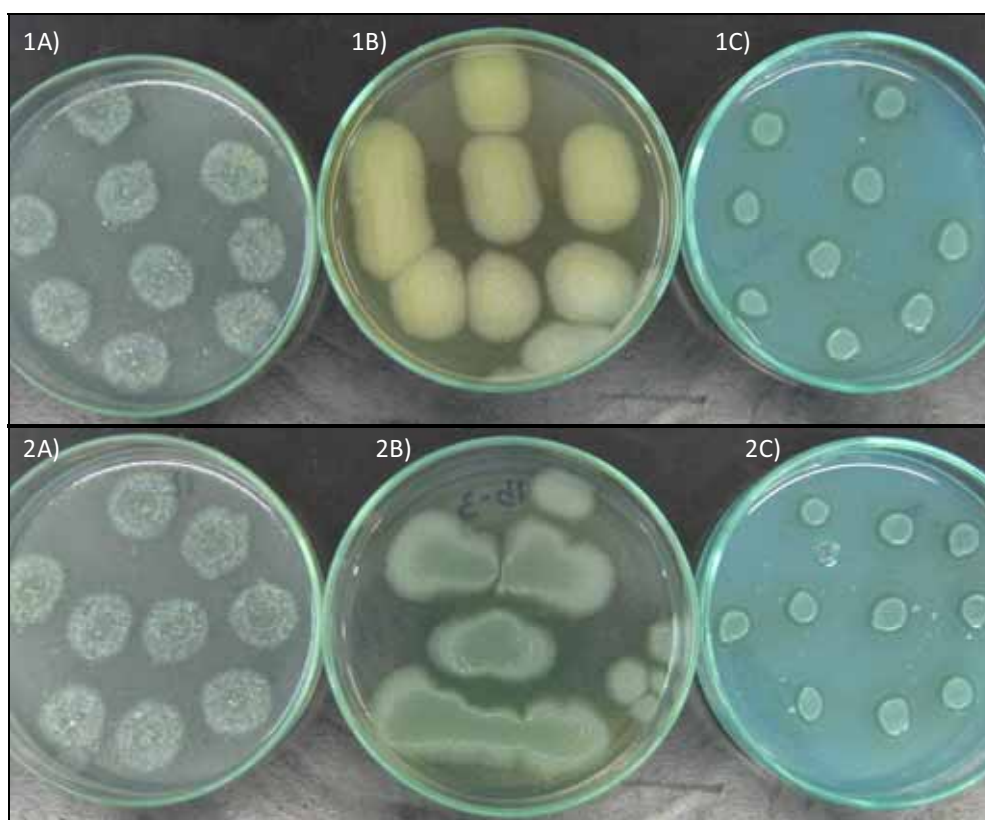


Figura 5 - Diferentes meios de cultivo para isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes. Placa “A” – teste “cálcio-trioleína”; placa “B” – teste “King B. medium” e placa “C” – teste “Blue-agar”. (1 - L2-1 e 2 - B1-3).

Bacillus sp. produzem biossurfactantes da classe dos lipopeptídios, como por exemplo a surfactina produzida por *B. subtilis* (SANDRIN et al., 1990). *Acinetobacter sp.* estão relacionadas com a produção de biossurfactantes de baixa massa molar, como por exemplo o emulsan e o biodispersan produzidos por *A. calcoaceticus* (ROSENBERG, 1993). Já *Burkholderia sp.* produzem biossurfactantes da classe dos ramnolipídios (HAUBLER et al, 2003). As espécies de *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Burkholderia* isoladas neste trabalho não foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio de cultura, não produzindo biossurfactantes. Isto pode ser explicado por 2 motivos: as espécies isoladas não são produtoras de biossurfactantes e/ou as espécies isoladas não foram capazes de crescer no meio salino ou não foram hábeis de utilizar as fontes de carbono e nitrogênio propostas no projeto.

Sendo assim, os isolados *Pseudomonas* L2-1 e B1-3 foram selecionados para a cinética de produção por sua capacidade de crescer e produzir ramnolipídios nos meios de cultivo propostos. Os microrganismos também tiveram sua identificação confirmada por análise filogenética baseado na sequência do RNA ribossomal 16S, pertencendo a espécie *P. aeruginosa*.

CAPÍTULO 2 – Cinética de crescimento e produção de ramnolipídios e PHAs.

Caracterização dos monômeros de PHA e homólogos de ramnolipídios.

5.2.1 - Crescimento dos microrganismos selecionados em manipueira, glicerol e óleo de fritura

Com o objetivo de se encontrar uma fonte de carbono alternativa e adequada para a produção de ramnolipídios, diferentes fontes de carbono, incluindo uma convencional (glicerol) e dois substratos não-convencionais (manipueira e óleo de fritura) foram avaliadas. A produção de PHAs também foi determinada, pois de acordo com a via biossintética de produção de ramnolipídios (Figura 4) há vários passos em comum com a de produção dos PHAs. Todas as bactérias usadas (*P. aeruginosa* L2-1, B1-3, 7a e 6c) neste trabalho foram capazes de crescer e produzir ramnolipídios e PHAs quando cultivadas nos vários substratos utilizados, com a exceção de *P. aeruginosa* B1-3 em manipueira. Entretanto, quando este microrganismo foi cultivado em óleo de fritura e glicerol gerou 6,3 e 3,4 g/L de biomassa, respectivamente. Também foi observado um crescimento mínimo para este isolado em manipueira adicionada com óleo de fritura (MOF), uma indicação que este meio foi inadequado para o crescimento do microrganismo (Tabela 6).

Para todas as bactérias estudadas, o maior crescimento foi obtido em óleo de fritura (linhagem 7a alcançando 6,8 g/L de biomassa), enquanto que em manipueira obteve-se as menores quantidades de biomassa (2,5 g/L para a bactéria 7a) (Tabela 6). Embora exista aproximadamente duas vezes mais fonte de carbono disponível no substrato combinado MOF quando comparados com os mesmos substratos individualmente (manipueira e óleo de fritura), a biomassa final obtida não foi superior.

Tabela 6

Efeito das fontes de carbono alternativas sobre o crescimento celular, produção de ramnolipídios e PHAs pelos isolados de *P. aeruginosa* após 120 h de incubação.

Parâmetros		Substrato			
		M ^a	MOF ^b	OF ^c	Glicerol
Bactérias					
L2-1	CDW ^d (g/L)	3,3 ± 0,1	4,2 ± 0,1	6,2 ± 0,6	3,1 ± 0,1
	Rha ^e (mg/L)	300,3 ± 18,1	609,1 ± 75,1	245,6 ± 15,1	248,7 ± 4,3
	% PHA ^f	17,6 ± 1,3	39 ± 1,4	43 ± 2,1	4,6 ± 0,4
B1-3	CDW (g/L)	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	6,3 ± 0,3	3,4 ± 0,2
	Rha (mg/L)	4,1 ± 2,3	4,2 ± 1,2	256,2 ± 19,1	188,1 ± 12,1
	% PHA	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	44,2 ± 1,7	7,8 ± 0,1
7a	CDW (g/L)	2,5 ± 0,2	3,1 ± 0,1	6,8 ± 0,2	3,8 ± 0,1
	Rha (mg/L)	169,9 ± 20,1	129,2 ± 12,4	273,1 ± 23,1	264,2 ± 18,2
	% PHA	4,6 ± 0,2	3,4 ± 0,1	50,4 ± 1,3	16,8 ± 0,3
6c	CDW (g/L)	2,8 ± 0,3	3,2 ± 0,2	6,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
	Rha (mg/L)	176,1 ± 15,6	179,4 ± 23,9	245,4 ± 18,2	175,3 ± 23,2
	% PHA	3,8 ± 0,3	12,2 ± 0,1	48,4 ± 2,1	22,2 ± 0,4

^aM: manipueira; ^bMOF: manipueira adicionado com óleo de fritura; ^cOF: óleo de fritura;

^dCDW: peso seco de células; ^eRha: ramnolipídios; ^fConteúdo de PHA (% CDW).

5.2.2 - Produção de ramnolipídios e PHAs

A Tabela 6 mostra o efeito das fontes alternativas de carbono sobre o crescimento celular, produção de ramnolipídios e PHAs pelos isolados de *P. aeruginosa* após 120 h de incubação. Em relação a produção de PHAs, para todas as bactérias testadas o óleo de fritura foi o melhor substrato alcançando uma produção de PHA de 43 a 50,4% do peso seco de células (CDW). Em substratos hidrofílicos como glicerol e manipueira, o conteúdo de PHAs variou entre 1,2 a 22,2%. Já para o meio MOF, que contém fontes hidrofílicas e hidrofóbicas de carbono, houve uma grande variação no conteúdo de PHAs, desde 39% (linhagem L2-1) a 3,1% (linhagem 7a) do peso seco de células (CDW). Devido ao crescimento mínimo observado para a linhagem B1-3, a produção de PHAs e ramnolipídios para este microrganismo também foi mínima. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde em substratos hidrofóbicos, como resíduos da produção de óleos (borra oleosa e óleo de fritura) foram obtidos maiores quantidades de PHA quando comparados com substratos hidrofílicos, acumulando em alguns casos mais de 54,6 % (FERNANDEZ et al., 2005; HABA et al., 2007, MARSUDI et al., 2008).

A produção de ramnolipídios mostrou uma considerável variação dependendo da fonte de carbono e da bactéria utilizada. Em glicerol, as concentrações variaram entre 175,3 (linhagem 6c) a 264,2 mg/L (linhagem 7a) enquanto que em óleo de fritura as concentrações variaram entre 245,3 (linhagem 6c) a 271,1 mg/L (linhagem 7a). Para o substrato manipueira, a faixa de variação foi de 169,9 (linhagem 7a) a 300,3 mg/L (linhagem L2-1), porém as maiores variações foram observadas para o meio MOF, cuja concentração de ramnolipídios variou entre 129,2 (linhagem 7a) a 609,1 mg/L (linhagem L2-1).

Assim como para PHAs, a produção de ramnolipídios foi geralmente maior em substratos hidrofóbicos do que em hidrofílicos, corroborando com trabalhos anteriores (NITSCHKE et al., 2005b). Entretanto, substratos hidrofílicos podem se tornar mais vantajosos devido à ausência de certos problemas analíticos como, a presença de óleo residual no caldo de cultura no final da fermentação, além da maior facilidade de determinação da fonte de carbono.

As diferentes concentrações de ramnolipídios e PHAs encontradas para os diferentes isolados se deve a características individuais de cada linhagem e também está relacionado

com a fonte de carbono. Para todos os isolados, o óleo de fritura se mostrou um substrato em potencial para a produção de PHA, já a manipueira e o meio combinado MOF mostraram-se variáveis de acordo com o microrganismo cultivado nestes substratos, sendo que o isolado L2-1 obteve as maiores concentrações de produto.

No ano de 2008, entrou em vigor a Lei Federal 11.097/05 (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel) que estabelece que todos os postos de combustíveis tenham o B2, ou seja, 2% de biodiesel misturado ao diesel de petróleo. Desde que a lei foi aprovada, 41 unidades produtoras de biodiesel foram autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP) e 40 estão em finalização de processo. A capacidade atual para produção de biodiesel no Brasil é de 1,88 bilhões de litros/ano e a demanda de B2 para o ano de 2008 foi de 840 milhões de litros. Sendo assim, foram geradas cerca de 80 mil toneladas de glicerol, um dos subprodutos do biocombustível, apenas no ano de 2008 nas usinas de biodiesel. Portanto novas tecnologias terão que ser geradas para solucionar o destino do glicerol, como por exemplo, a conversão do glicerol em biomassa celular ou em produtos metabólicos de diversos microrganismos, caso dos ramnolipídios e PHAs produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Os resultados obtidos demonstraram que o glicerol e manipueira possuem potencialidade como substratos alternativos para a produção de ramnolipídios, e que os substratos óleo de fritura e manipueira adicionado com óleo de fritura podem ser usados para a simultânea produção de PHAs e ramnolipídios. Neste último substrato, a bactéria L2-1 alcançou um razoável crescimento (4,2 g/L) e obteve-se uma boa produção de PHAs (39% CDW) e uma excelente produção de ramanolipídios (609,1 mg/L) (Tabela 6).

5.2.3 - Cinética de crescimento e produção de ramnolipídios e PHAs

A cinética de produção de ramnolipídios e PHAs foi realizada com a linhagem L2-1 com o intuito de correlacionar o crescimento com a síntese dos produtos. Como mostrado nas Figuras 6, 7, 8 e 9 em todos os substratos a síntese de PHA ocorreu durante a fase exponencial de crescimento, nas primeiras 48 horas, com exceção do substrato MOF, no qual o crescimento celular se estendeu até 72 horas (Figura 9). Para ramnolipídios, a produção é

máxima em torno de 72 horas em todos os substratos, com exceção do MOF no qual a produção máxima ocorreu em 96 horas.

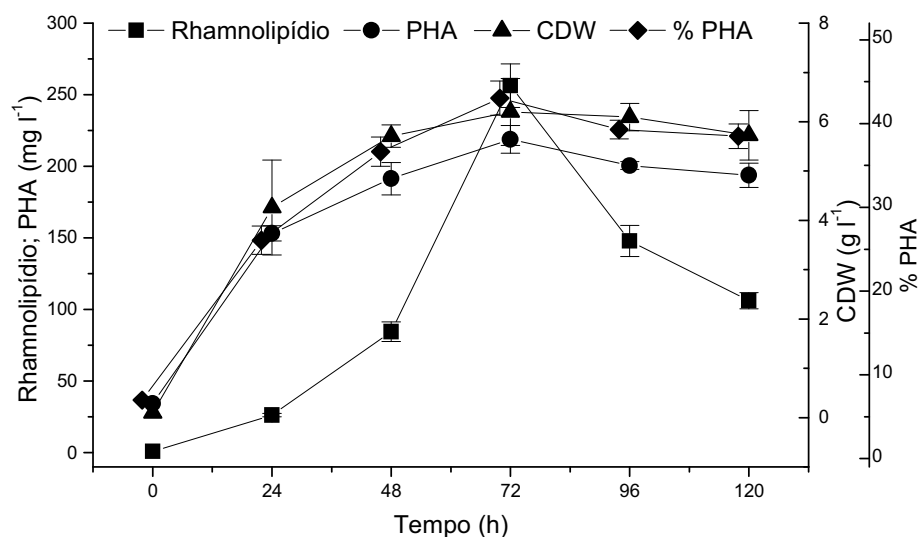


Figura 6 – Crescimento (CDW), produção de rhamnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato óleo de fritura.

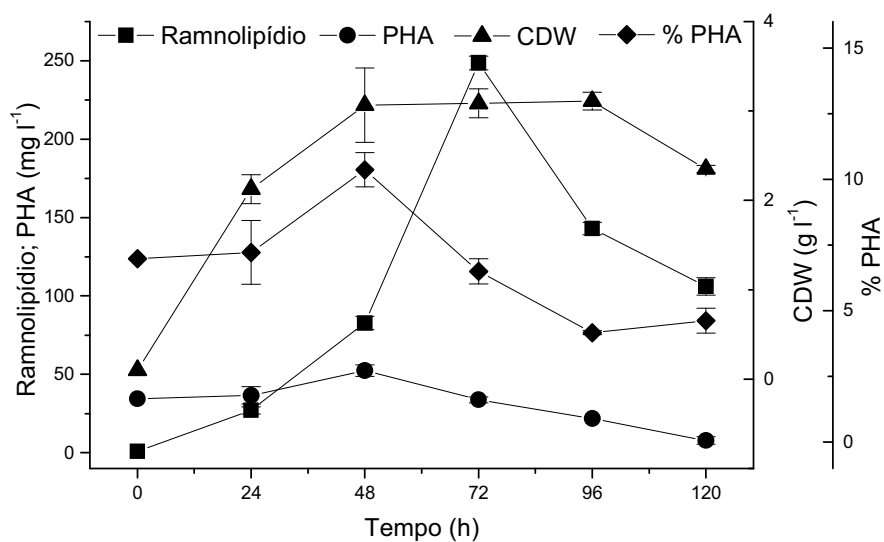


Figura 7 – Crescimento (CDW), produção de ramnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato glicerol.

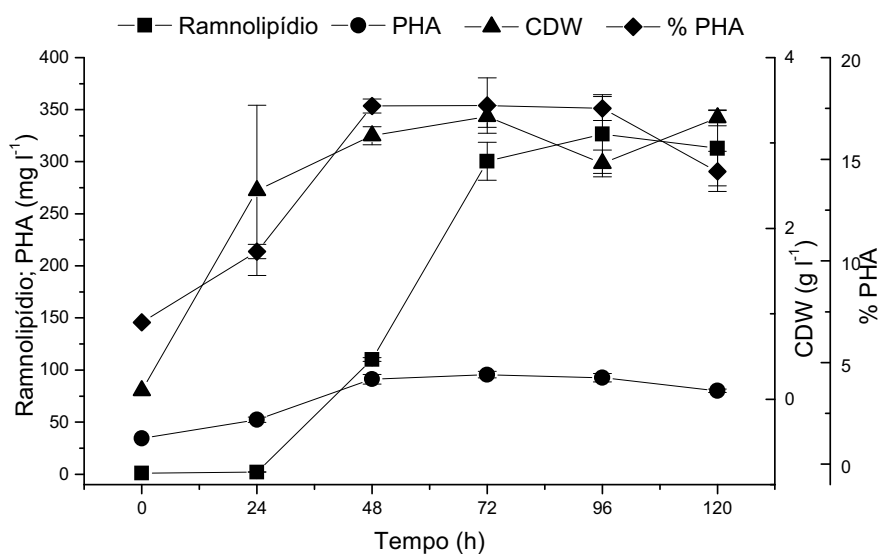


Figura 8 – Crescimento (CDW), produção de ramnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato manipueira.

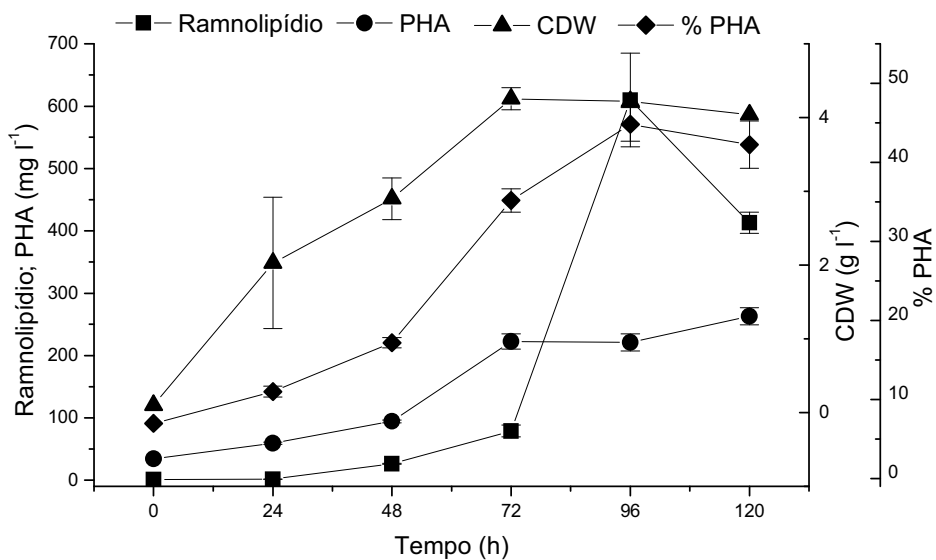


Figura 9 – Crescimento (CDW), produção de ramnolipídios e PHA para o microrganismo L2-1 no substrato MOF.

O perfil de crescimento do isolado L2-1 em MOF diferiu dos outros substratos. Em glicerol, manipueira e óleo de fritura, o crescimento máximo foi atingido durante as primeiras

48 horas e a biomassa permaneceu constante até o final do cultivo como pode ser observado nas Figuras 6, 7, e 8 enquanto que em MOF, a biomassa bacteriana alcançou o máximo em 72 horas (Figura 9).

Em manipueira, a bactéria L2-1 produziu PHAs durante a fase exponencial de crescimento e a produção cessou após 48 horas (Figura 8). Em óleo de fritura, a produção de PHAs iniciou-se na fase exponencial e se estendeu até a fase estacionária de crescimento, por volta de até 72 horas de crescimento. Em MOF, a produção de PHAs ocorreu somente durante a fase exponencial de crescimento que se estendeu até 72 horas (Figura 9). Para o substrato glicerol, a produção de PHAs ocorreu apenas durante a fase exponencial de crescimento, até 48 horas de crescimento, sendo que após este período houve um decréscimo no conteúdo de PHAs (Figura 7).

Hori et al., (2001) trabalhando com *P. aeruginosa* IFO3924 e usando glicose como fonte de carbono, demonstraram que tanto a síntese de ramnolipídios quanto a de PHAs iniciou-se após a fase exponencial de crescimento da bactéria e que a produção máxima foi alcançada após o consumo total da fonte de carbono. O acúmulo de PHA chegou a 10% da CDW após 36 h, seguida de sua rápida degradação. No meio glicerol, o acúmulo de PHA ocorreu nas primeiras 48 horas, após esse período houve uma diminuição na concentração do produto, que foi devida a sua degradação, já que os PHAs são considerados como produtos de reserva (Figura 7). Resultados similares foram obtidos por Koller et al., (2008) usando *P. hydrogenovora* em soro de queijo hidrolizado como fonte de carbono, onde a bactéria acumulou PHAs após a fase de crescimento. As diferenças no perfil de produção de PHAs neste trabalho e nos reportados na literatura podem ser devidas às condições de crescimento, meio de cultura, e as diferentes espécies de *Pseudomonas* e linhagens utilizadas.

5.2.4 - Consumo das fontes de carbono

O consumo de carbono para a bactéria L2-1 é mostrado na Tabela 7. Em manipueira, glicose e frutose foram exauridos após 48 horas de cultivo. Com a adição de óleo de fritura na manipueira, o açúcar foi consumido mais lentamente quando comparado ao meio manipueira sem a adição de óleo e após 72 horas detectou-se resíduos de açúcares.

Tabela 7

Consumo da fonte de carbono por *P. aeruginosa* L2-1 crescendo em manipueira, glicerol, óleo de fritura e MOF.

Tempo (h)	Manipueira		MOF ^a		Óleo		
	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose	OF ^b	Fritura	Glicerol
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
0	24,6 ± 1,5	30,1 ± 1,5	24,5 ± 1,3	30,1 ± 1,5	20,0 ± 0,1	20 ± 0,1	20 ± 0,1
24	9,8 ± 1,6	13,5 ± 1,2	17,0 ± 0,5	18,7 ± 0,9	17,6 ± 1,4	10,0 ± 1,1	13,1 ± 0,4
48	2,0 ± 1,0	0	5,2 ± 0,1	4,5 ± 1,0	16,4 ± 0,6	5,9 ± 1,4	7,5 ± 0,8
72	0	0	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,0	13,9 ± 0,9	5,3 ± 1,1	1,1 ± 0,6
96	0	0	2,2 ± 0,3	0	9,2 ± 1,1	4,9 ± 0,8	0
120	0	0	2,0 ± 0,1	0	2,4 ± 1,4	0,5 ± 0,1	0

^aMOF: manipueira adicionado com óleo de fritura; ^bOF: óleo de fritura

O glicerol é totalmente exaurido após 72 horas de crescimento. Já o óleo de fritura não é completamente metabolizado, restando resíduos de óleo após 120 horas, sendo que a maior parte do óleo foi consumida nas primeiras 48 horas de crescimento (70,5%). Entretanto, o consumo de óleo em MOF é consideravelmente reduzido quando comparado com óleo de fritura, sendo a maior parte do óleo consumida após 48 horas de crescimento (70%) (Tabela 7).

Comparando-se o perfil de produção de ramnolipídios, crescimento celular e consumo das fontes de carbono, nota-se que no meio MOF a maior parte de ramnolipídios foi produzida após 72 h, coincidindo com o início da fase estacionária de crescimento e também com o aumento do consumo de óleo. Para o substrato óleo de fritura a maior parte de

ramnolipídios também ocorreu durante a fase estacionária, mas o maior consumo de óleo ocorreu nas primeiras 48 horas de crescimento.

Óleos vegetais podem ser hidrolisados por lipases em espécies de *P. aeruginosa* formando longas cadeias de ácidos graxos compostas essencialmente de 12-18 carbonos. Estes ácidos graxos podem ser degradados via β -oxidação visando à obtenção de energia para promover o crescimento celular ou podem ser transformados em precursores lipídicos, promovendo a biossíntese de biossurfactantes (LANG & WULLBRANDT, 1999). Um dos papéis atribuídos ao biossurfactantes é auxiliar os microrganismos a crescer em substratos imiscíveis em água, reduzindo a tensão superficial do meio e fazendo com que o substrato se torne mais facilmente disponível (FIECHTER, 1992). Em MOF, a maior parte de ramnolipídios foi produzida após 72 h, coincidindo com o início da fase estacionária de crescimento. Nota-se pela Tabela 7 que o consumo do óleo no meio MOF aumentou consideravelmente (cerca de 70%) a partir das 72 h e este fato pode estar associado com uma das funções dos biossurfactantes que é auxiliar a dispersão e solubilização de substratos imiscíveis. Portanto, o maior consumo de óleo coincide com o maior aumento na produção de ramnolipídios (Figura 9). Entretanto, utilizando óleo de fritura como substrato, este fato não foi observado, sugerindo que o microrganismo apresenta outros mecanismos, como por exemplo, a produção de enzimas lipolíticas, para favorecer o consumo de óleo. A maior produção dos ramnolipídios em óleo de fritura ocorreu após as primeiras 48 h, fato que não coincidiu com o maior consumo da fonte de carbono.

5.2.5 - Cinética de produção das enzimas lipase e esterase

Nos substratos óleo de fritura e MOF, a bactéria L2-1 produziu lipases e esterases que degradaram os triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol (Figuras 10 e 11). A atividade máxima de lipase e esterase foi detectada no substrato óleo de fritura (90 U/mL de cultura para a esterase e 83 U/mL de cultura para a lipase). Já em MOF a atividade enzimática máxima foi de 76 U/mL de cultura para esterase e 41 U/mL de cultura para lipase. Em óleo de fritura como substrato (Figura 10), a atividade máxima das enzimas ocorreu em 48 h de crescimento e em MOF (Figura 11) a atividade foi máxima após 72 h de crescimento.

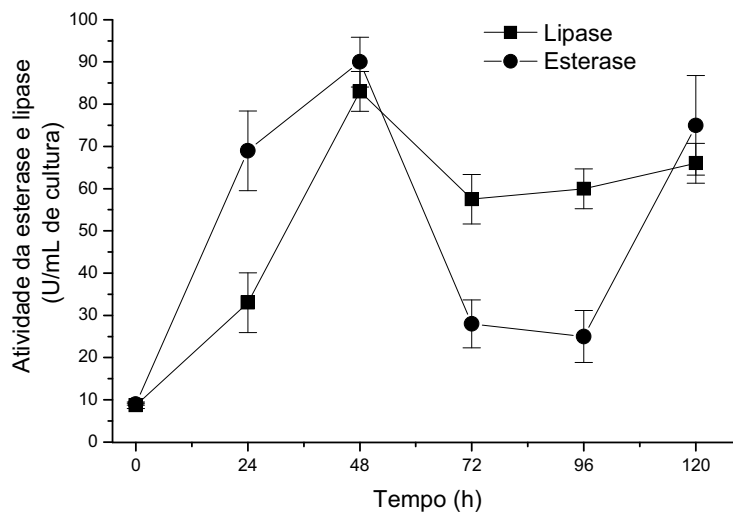


Figura 10 – Atividade das enzimas lipase e esterase para o microrganismo L2-1 no substrato óleo de fritura.

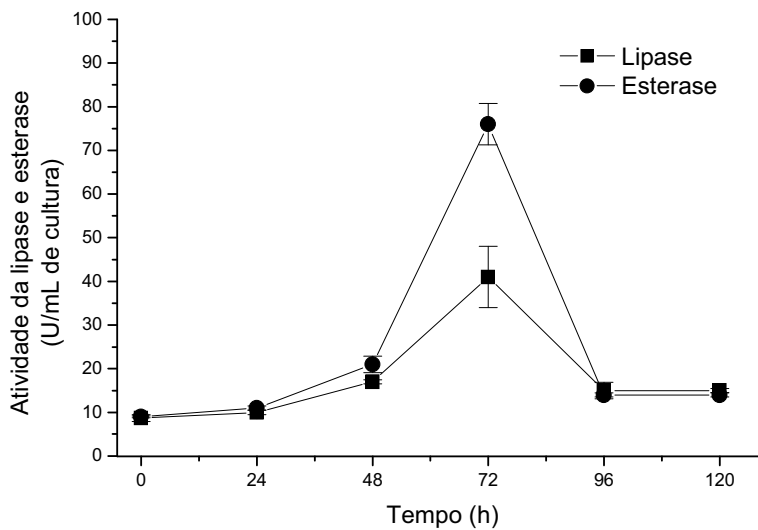


Figura 11 – Atividade das enzimas lipase e esterase para o microrganismo L2-1 no substrato MOF.

Também foi realizado o teste utilizando as placas de Lipase-Tributirina que confirmaram os resultados acima. O maior halo de hidrólise foi formado nos tempos 72, 96 e 120 horas para o substrato MOF e no substrato óleo de fritura o maior halo de hidrólise ocorreu nos tempos 24 e 48 horas. Para os substratos glicerol e manípueira, não houve a formação do halo e hidrólise, indicando que a lipase produzida pelo isolado L2-1 é induzida, ou seja, dependente da presença de substrato hidrofóbico para a produção (Figura 12).

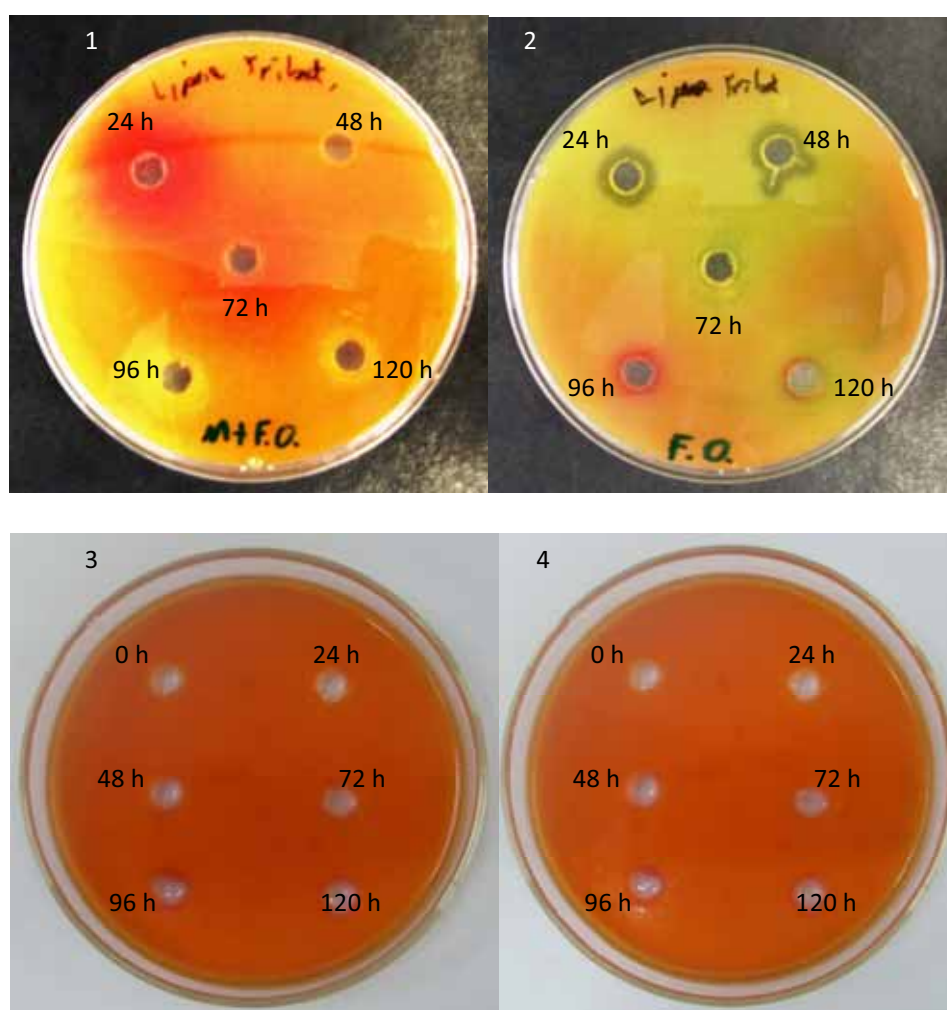


Figura 12 - Detecção da enzima lipase utilizando meio sólido (placas lipase-tributirina) para o microrganismo L2-1 (1 = substrato MOF; 2 = substrato óleo de fritura; 3 = substrato manípueira e 4 = substrato glicerol).

5.2.6 - Ramnolipídios como fonte de carbono e energia

Nos substratos óleo de fritura, glicerol e MOF observaram-se uma queda na concentração de ramnolipídios (Figuras 6, 7 e 9). Adicionou-se ramnolipídio no meio de cultura como única fonte de carbono com o intuito de se verificar a possibilidade do mesmo ser utilizado como fonte de energia. De acordo com a Figura 13, observou-se o crescimento do microrganismo quando o ramnolipídio constituía única fonte de carbono, sugerindo que a queda observada da concentração de ramnolipídios nas Figuras 6, 7 e 9 se deve a utilização como fonte energética, ocorrendo principalmente nos meios glicerol e óleo de fritura.

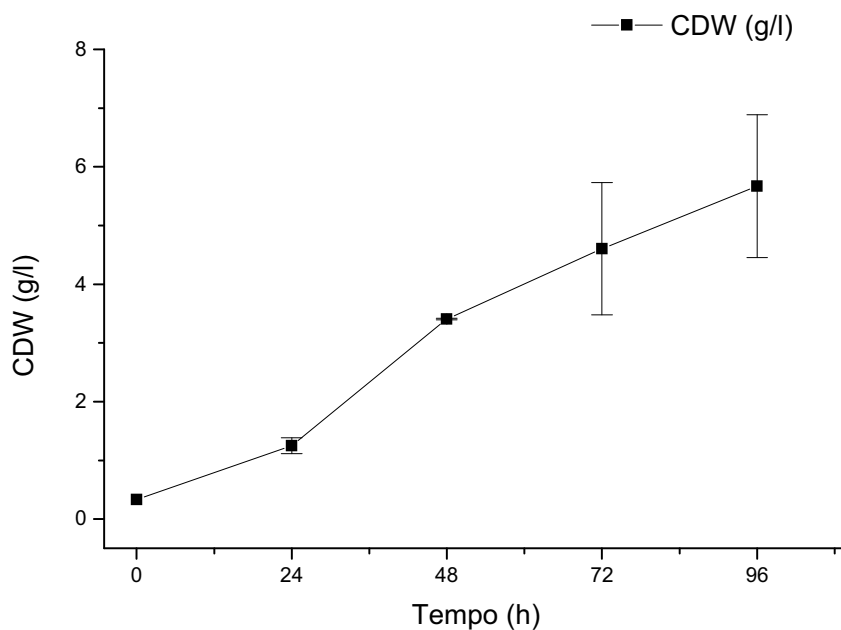


Figura 13 - Consumo de ramnolipídios por *P. aeruginosa* L2-1 (CDW = peso seco de células).

García-Junco et al., (2001) adicionaram ramnolipídio exógeno em culturas de *P. aeruginosa* que cresciam em fenantreno como fonte de carbono e notaram que houve uma maior solubilização do fenantreno no meio de cultivo, um maior crescimento bacteriano e utilização do ramnolipídio como fonte de carbono. Estes resultados mostram que os

ramnolipídios podem auxiliar os microrganismos a crescer em substratos imiscíveis em água e também podem ser utilizados como fonte energética.

5.2.7 - Caracterização dos PHAs

A composição de PHAs produzidos pelos isolados variaram de acordo com o substrato utilizado, sendo que o comprimento da cadeia (entre C_8 e C_{16}) e o nível de insaturação dos monômeros mostraram consideráveis variações (Tabelas 8, 9 10 e 11). PHAs com cadeia mais curta que C_8 não foram encontrados. Em glicerol os principais monômeros de PHAs foram $C_{10:0}$ (62,8%), $C_{8:0}$ (17,8%) e $C_{12:0}$ (15,91%), e o total de proporção de insaturação dos monômeros foi de 1,7% ($C_{12:1}$, $C_{14:1}$ e $C_{14:2}$), estes valores são para a linhagem L2-1. Em manípueira, a composição foi muito similar com C_{10} , C_8 e C_{12} representando 64,9%, 16,2% e 17% do total, respectivamente. O total de monômeros insaturados representou apenas 1,3% da composição total, valores válidos para a linhagem L2-1. Observa-se que os substratos manípueira e glicerol produziram PHA de composição muito similar para todas as linhagens estudadas.

Quando o substrato utilizado foi óleo de fritura, a quantidade total dos monômeros de PHA de cadeia C_8 aumentou, representando 37,5% enquanto que C_{10} e C_{12} representaram 42,1% e 13,2% do total de monômeros para a linhagem L2-1, respectivamente. O total de monômeros insaturados foi de 4,8%. No substrato MOF, a composição dos monômeros de PHA é intermediária entre a distribuição encontrada para o meio de manípueira e óleo de fritura isolados. A quantidade total dos monômeros de PHA de cadeia C_8 representou 26,4% do total, enquanto C_{10} e C_{12} representaram 50,6% e 15,7% do total, respectivamente, para a linhagem L2-1. O total de monômeros insaturados foi de 5,2%.

Tabela 8

Composição dos PHAs produzidos em glicerol pelas linhagens de *P. aeruginosa* estudadas após 72h de incubação.

Bactéria	Quantidades relativas dos monômeros de PHA (%)									
	%	PHA								
	PHA	(mg/L)	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{12:1}	C _{14:1}	C _{14:2}
<i>P. aeruginosa</i> L2-1	10,36	52,4	17,82	62,8	15,91	1,62	0,1	0,96	0,38	0,41
<i>P. aeruginosa</i> B1-3	7,96	28,2	20,56	55,9	15,01	7,09	1,41	0,31	0,54	0
<i>P. aeruginosa</i> 6c	22,1	11,6	20,68	65,83	11,96	0,51	0	0,85	0,17	0
<i>P. aeruginosa</i> 7a	16,86	91,2	17,32	69,73	11,67	0,43	0	0,64	0,21	0

Tabela 9

Composição dos PHAs no substrato óleo de fritura produzido por todas as linhagens de *P. aeruginosa* estudadas após 72h de incubação.

Bactéria	Quantidades relativas dos monômeros de PHA (%)									
	%	PHA								
	PHA	(mg/L)	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{12:1}	C _{14:1}	C _{14:2}
<i>P. aeruginosa</i> L2-1	43,04	218,8	37,57	42,12	13,21	2,17	0,07	2,24	1,61	1,01
<i>P. aeruginosa</i> B1-3	44,18	300,6	32,13	43,84	15,96	2,36	0,13	2,39	1,86	1,33
<i>P. aeruginosa</i> 6c	48,5	280,12	32,93	41,13	16,21	3,2	0,14	2,77	2,2	1,42
<i>P. aeruginosa</i> 7a	50,56	302,16	33,01	41,43	16,37	2,89	0,19	2,63	2,1	1,38

Tabela 10

Composição dos PHAs no substrato manipueira produzido por todas as linhagens de *P. aeruginosa* estudadas após 72h de incubação.

Bactéria	Quantidades relativas dos monômeros de PHA (%)									
	%	PHA								
	PHA	(mg/L)	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{12:1}	C _{14:1}	C _{14:2}
<i>P. aeruginosa</i> L2-1	19,58	99,8	16,22	64,9	17,02	0,52	0,05	1,04	0,17	0,08
<i>P. aeruginosa</i> B1-3	1,32	6,8	27,05	61,46	5,9	2,57	2,12	0,3	0,3	0,3
<i>P. aeruginosa</i> 6c	2,88	21,4	9,79	76,53	10,82	1,03	0,05	0,67	0,15	0,05
<i>P. aeruginosa</i> 7a	4,64	23,8	12,79	75,86	9,54	0,91	0,08	0,61	0,17	0,0

Tabela 11

Composição dos PHAs produzidos através das linhagens de *P. aeruginosa* crescendo no substrato MOF após 72h de incubação.

Bactéria	Quantidades relativas dos monômeros de PHA (%)									
	%	PHA								
	PHA	(mg/L)	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{12:1}	C _{14:1}	C _{14:2}
<i>P. aeruginosa</i> L2-1	39,14	202,4	26,41	50,67	15,72	1,8	0,16	2,29	1,76	1,19
<i>P. aeruginosa</i> B1-3	0,42	2,02	34,5	48,8	8,1	4,1	1,8	1,5	0,6	0,6
<i>P. aeruginosa</i> 6c	13,0	62,8	26,66	53,05	14,77	3,2	0,16	1,11	0,72	0,33
<i>P. aeruginosa</i> 7a	3,64	20,02	3,38	74,57	12,87	6,21	1,12	1,12	0,45	0,28

P. aeruginosa é capaz de sintetizar e acumular grandes quantidades de PHAs que consistem de vários ácidos graxos 3-hidroxi com comprimento da cadeia entre 6 e 16 carbonos. A composição dos PHAs é dependente da fonte de carbono e da rota metabólica envolvida. A β oxidação é a principal via quando ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono e a biossíntese *de novo* do ácido graxo é a principal rota durante crescimento em fontes de carbono tais como açúcares, acetato ou etanol (SUDESH et al., 2000).

Um fator que está relacionado à composição dos monômeros é a fonte de carbono utilizada. Quando *Pseudomonas* é cultivada em glicerol e açúcares, o substrato metabolizados a acetil-CoA produzem um polímero contendo $C_{10:0}$ como principal constituinte e $C_{8:0}$ e $C_{12:0}$ como constituintes secundários. E quando cultivadas em ácidos graxos, a composição do polímero produzido está estruturalmente relacionada ao substrato fornecido (EGGINK et al., 1992). A mudança na composição dos monômeros e no nível de insaturação observado em óleo de fritura e em fontes de carbono hidrofílicas está de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura. Haba et al., (2007) e Marsudi et al., (2008), trabalhando com outras linhagens de *P. aeruginosa* e utilizando óleo vegetal ou resíduos oleosos como fonte de carbono, observaram que a composição dos monômeros de PHAs foi de: C_{10} (43-48%), C_{12} (11-15%) e C_8 (10-38%) com uma alta proporção relativa de monômeros insaturados (5-15%).

A origem dos monômeros insaturados foi estudada por Tan et al., (1997) em *P. putida* PGA1, usando óleo de palma saponificado [SPKO, uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados], ácido mirístico (um ácido graxo saturado), ácido laurico (ácido graxo saturado) e ácido oléico (um ácido graxo insaturado). Os PHAs derivados dos ácidos laurico e mirístico continham apenas monômeros saturados enquanto que os PHAs derivados de SPKO e ácido oléico continham monômeros saturados e insaturados. Portanto, a presença de insaturação na fonte de carbono pode explicar o aumento no nível da proporção de duplas ligações dos monômeros de PHAs observadas nas células quando cultivadas em óleo e comparadas com glicerol (Tabela 2). O alto nível de insaturação dos monômeros de PHA é característico da via β oxidação quando ácidos graxos são usados como fonte de carbono contendo um alto nível de insaturação. Como a bactéria B1-3 apresentou crescimento mínimo nos substratos manipueira e MOF, a porcentagem de PHA em relação ao peso seco de células foi baixa, não passando de 1,32% do total (Tabelas 10 e 11). A linhagem L2-1 foi a que apresentou o melhor resultado em concentração e porcentagem de PHA no substrato MOF, com 202,4 mg/L e 39,4% respectivamente (Tabela 11). Entretanto, em óleo de fritura, todos os isolados

apresentaram excelentes taxas de acúmulo de PHA, chegando a 50,5% do total de PHA para a linhagem 7a. No meio óleo de fritura observou as maiores concentrações finais de PHA para todas as linhagens (Tabela 9). Já nos outros substratos, houve uma significativa variação na produção, com a bactéria L2-1 se destacando sobre as demais. Em relação a composição dos monômeros de PHAs, não houve uma variação significativa na composição, sugerindo que para todos os microrganismos a distribuição foi relativamente constante, havendo variação em termos de concentração e do tipo de fonte de carbono utilizada (Tabelas 8, 9 10 e 11).

5.2.8 - Caracterização dos ramnolipídios

As bactérias estudadas foram capazes de sintetizar ramnolipídios em todos os substratos utilizados, apesar da produção com a bactéria B1-3 nos substratos manipueira e MOF ser mínima. As Tabelas 12, 13, 14 e 15 mostram a abundância relativa dos ramnolipídios produzidos pelos isolados nos substratos estudados. Os homólogos mais abundantes foram RhaC₁₀C₁₀ e RhaRhaC₁₀C₁₀, porém outros homólogos estão presentes em menores quantidades. O diramnolipídio RhaRhaC₁₀C₁₀ foi o homólogo predominante em todos os substratos avaliados, com exceção do meio MOF, onde o monoramnolipídio RhaC₁₀C₁₀ foi predominante para as linhagens 6c e 7a (Tabelas 14 e 15). Uma alta proporção RhaRhaC₁₀C₁₀/RhaC₁₀C₁₀ foi obtida com a linhagem L2-1 no substrato MOF (Tabela 12). Ao contrário do que foi observado para os PHAs, a proporção dos ramnolipídios insaturados não variou entre os substratos testados (glicerol, manipueira e óleo de fritura).

Tabela 12

Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de *P. aeruginosa* L2-1 após 120 horas de incubação nos diferentes substratos.

Ramnolipídio (%)	Substrato			
	M ^a	MOF ^b	OF ^c	Glicerol
RhaC8C8	0,07	0,27	ND ^d	ND
RhaC10C8	2,83	5,34	1,52	4,29
RhaC10C10	32,16	19,61	25,81	21,01
RhaC10C12	0,32	1,16	5,79	6,78
RhaC12C12	ND	ND	0,45	0,05
RhaRhaC10C8	6,9	5,71	2,94	8,59
RhaRhaC10C10	38,06	59,15	47,43	42,6
RhaRhaC10C12	8,29	0,48	6,68	7,03
RhaRhaC12C12	ND	ND	0,98	0,7
RhaC10C10:1	0,27	0,59	0,41	0,29
RhaC10C12:1	4,93	1,36	4,02	3,49
RhaC12C12:1	ND	ND	0,04	ND
RhaRhaC10C10:1	0,31	0,56	0,2	0,44
RhaRhaC10C12:1	5,44	5,72	3,31	3,53
RhaRhaC12C12:1	0,38	ND	0,42	0,58

^aM: manipueira; ^bMOF: manipueira adiconado com óleo de fritura;

^cOF: óleo de fritura; ^dND: não detectado.

Tabela 13

Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de *P. aeruginosa* B1-3 após 120 h de incubação nos diferentes substratos.

Ramnolipídio (%)	Substrato			
	M ^a	MOF ^b	OF ^c	Glicerol
RhaC ₈ C ₈	ND ^d	ND	ND	ND
RhaC10C8	0,94	1,11	1,21	4,28
RhaC10C10	25,15	20,83	23,91	16,74
RhaC10C12	3,14	4,16	1,67	2,44
RhaC12C12	ND	ND	0,09	ND
RhaRhaC10C8	0,62	0,55	2,55	10,81
RhaRhaC10C10	53,45	51,11	47,75	49,49
RhaRhaC10C12	7,23	11,94	11,76	7,72
RhaRhaC12C12	ND	ND	0,11	0,43
RhaC10C10:1	ND	ND	0,49	0,31
RhaC10C12:1	3,14	2,77	4,84	2,17
RhaC12C12:1	ND	ND	ND	0,17
RhaRhaC10C10:1	ND	ND	0,63	0,03
RhaRhaC10C12:1	6,28	6,66	5,21	0,63
RhaRhaC12C12:1	0,62	0,83	1,39	4,69

^aM: manipueira; ^bMOF: manipueira adiconado com óleo de fritura;

^cOF: óleo de fritura; ^dND: não detectado.

Tabela 14

Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de *P. aeruginosa* 6c após 120 h de incubação nos diferentes substratos.

Ramnolipídio (%)	Substrato			
	M ^a	MOF ^b	OF ^c	Glicerol
RhaC8C8	0,03	0,19	ND ^d	ND
RhaC10C8	2,32	3,81	1,46	ND
RhaC10C10	26,14	43,09	25,6	17,3
RhaC10C12	ND	0,61	5,58	3,68
RhaC12C12	ND	ND	ND	4,52
RhaRhaC10C8	4,64	4,1	2,65	ND
RhaRhaC10C10	40,93	29,39	46,58	49,31
RhaRhaC10C12	12,45	5,33	7,79	8,4
RhaRhaC12C12	ND	ND	0,56	7,43
RhaC10C10:1	ND	ND	ND	0,61
RhaC10C12:1	0,21	0,64	0,2	ND
RhaC12C12:1	7,39	9,19	4,37	0,19
RhaRhaC10C10:1	ND	0,03	0,44	3,13
RhaRhaC10C12:1	0,28	0,5	ND	0,36
RhaRhaC12C12:1	4,79	2,55	0,37	ND

^aM: manipueira; ^bMOF: manipueira adiconado com óleo de fritura;

^cOF: óleo de fritura; ^dND: não detectado.

Tabela 15

Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos de *P. aeruginosa* 7a após 120 h de incubação nos diferentes substratos.

Ramnolipídio (%)	Substrato			
	M ^a	MOF ^b	OF ^c	Glicerol
RhaC8C8	ND ^d	0,21	ND	ND
RhaC10C8	2,84	0,41	0,65	1,93
RhaC10C10	30,34	40,96	25,82	12,15
RhaC10C12	ND	0,27	0,64	0,37
RhaC12C12	ND	ND	0,03	ND
RhaRhaC10C8	4,66	4,03	1,59	7,77
RhaRhaC10C10	38,12	33,18	41,82	47,47
RhaRhaC10C12	10,7	5,62	13,68	17,14
RhaRhaC12C12	ND	ND	0,13	0,14
RhaC10C10:1	0,22	0,56	0,24	0,17
RhaC10C12:1	8,22	7,13	8,48	5,4
RhaC12C12:1	ND	0,05	ND	ND
RhaRhaC10C10:1	0,25	0,48	0,42	0,52
RhaRhaC10C12:1	3,97	2,56	5,0	5,42
RhaRhaC12C12:1	0,63	0,61	1,45	1,48

^aM: manipueira; ^bMOF: manipueira adiconado com óleo de fritura;

^cOF: óleo de fritura; ^dND: não detectado.

Os dois principais homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* em cultura líquida são RhaC₁₀C₁₀ e RhaRhaC₁₀C₁₀. Todos estes compostos contêm um ou dois grupos de ramnose ligados a um ou dois ácidos graxos 3-hidroxi de diferentes comprimentos e que podem ser saturados ou insaturados (NITSCHKE et al., 2005b; SOBERÓN-CHAVÉZ, et al., 2005). As várias combinações destes grupos geram uma grande quantidade de possíveis homólogos de ramnolipídios. Os métodos utilizados para o isolamento e análise química dos ramnolipídios envolvem uma separação cromatográfica das misturas em várias frações por cromatografia de camada delgada (TLC), frequentemente seguida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estas frações semi-purificadas quando analisadas por espectrometria de massa permitem a caracterização das misturas de ramnolipídios (DÉZIEL et al., 1999). A técnica LC/MS utilizando ionização do tipo “electrospray” usada neste trabalho é um método simples de se estudar o perfil das misturas de ramnolipídios sintetizados por *P. aeruginosa*, principalmente em culturas contendo manípueira como fonte de carbono, onde produtos solúveis no meio interferem na técnica tradicionalmente usada (método colorimétrico descrito por CHANDRASENKARAN & BEMILLER, 1980). Além disso, essa técnica permite a caracterização direta do ramnolipídios no meio de cultivo evitando erros devido a perda dos mesmos durante os passos de purificação.

A relação de ácidos graxos saturados e insaturados no óleo de fritura usado como substrato foi de 20,17% para saturados e 79,83% para insaturados (p/p) e a relação de insaturação e saturação dos ácidos graxos dos ramnolipídios foi de 91,6% para saturados e 8,4% para insaturados (p/p). Usando glicerol como fonte de carbono, o total de saturados foi de 91,67% e dos insaturados foi de 8,33% (p/p). Entretanto, para PHA houve um aumento no grau de insaturação quando óleo foi utilizado como fonte de carbono, comparado com glicerol, passando de 1,3% com glicerol para 4,8% para o óleo de fritura como substrato. Alguns autores verificaram que o total de ácidos graxos insaturados na fonte de carbono reflete no nível de insaturação da cadeia de ramnolipídios. Benincasa & Accorsini (2008) reportaram que o total de ácidos graxos em resíduos da refinaria de óleo de girassol utilizados como substrato foi de 50% e que o total de cadeias insaturadas na mistura de ramnolipídios foi de 30,9%. Abalos et al., (2001) utilizando resíduos da refinaria de óleo de soja contendo um total de 41,6% (p/p) de C_{18:2} encontraram um total de ácidos graxos na mistura de ramnolipídios de 27% (p/p). Haba et al., (2000) reportaram uma mistura de ramnolipídios contendo 16,5% (p/p) de ácidos graxos insaturados quando o microrganismo foi cultivado em óleo de fritura contendo um total de 21,1% de C_{18:2}. Os resultados encontrados neste trabalho

foram diferentes com os da literatura, onde o grau de insaturação da fonte de carbono não refletiu no nível de insaturação na mistura de ramnolipídios.

Mata-Sandoval et al., (2001) verificaram que *P. aeruginosa* UG2 produz misturas de surfactantes com composição similares de ramnolipídios, independente da fonte de carbono utilizada. Entretanto Deziel et al., (1999) demonstraram que os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* 57RP diferem qualitativamente e quantitativamente dependendo da fonte de carbono. O uso de manitol como fonte de carbono conduz à ramnolipídios contendo duas cadeias de ácido graxo, já o uso de naftaleno conduz a 80% dos ramnolipídios com apenas uma cadeia de ácido graxo. Rahman et al., (2002) reportaram a produção de ramnolipídios por duas espécies de *P. aeruginosa* DS10-129 e GS9-119 usando óleo de soja, óleo de girassol e glicerol como substratos. Óleo de soja foi considerado o melhor substrato, com um maior aumento da biomassa e produção de surfactante. Os autores também observaram que o diramnolipídio RhaRhaC₁₀C₁₀ foi o homólogo predominante. Em contraste, Nitschke et al., (2005a) encontraram que o monoramnolipídio RhaC₁₀C₁₀ foi o homólogo predominante na cultura de *P. aeruginosa* LBI quando substratos oleosos foram utilizados como fonte de carbono e o diramnolipídio RhaRhaC₁₀C₁₀ foi predominante em glicerol. Os dados reportados na literatura e os dados encontrados neste trabalho mostram que diferentes condições de cultivo, meio de crescimento utilizado, idade da cultura e diferentes linhagens de *Pseudomonas* influenciam na distribuição dos homólogos de ramnolipídios, sem contar os diferentes procedimentos de análise e extração dos mesmos.

A Tabela 16 mostra os valores da tensão superficial para todas as bactérias e substratos avaliados. Entre os vários substratos testados, o surfactante produzido a partir do meio MOF e microrganismo L2-1 mostrou a menor tensão superficial, 30 mN/m.

Tabela 16

Valores de tensão superficial (mN/m) dos ramnolipídios obtidos para todas as linhagens e substratos avaliados.

	Substrato			
	<i>P. aeruginosa</i>	Manipueira	MOF	Óleo fritura
L2-1	31,2	30	33	35
B1-3	34,8	34,8	34	34,5
6c	31	31	31,8	34,8
7a	30,8	31	32	34

Os valores obtidos de tensão superficial estão de acordo com os valores reportados por outros autores (NITSCHKE et al., 2005a; COSTA et al., 2006; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008) e sugerem que os ramnolipídios produzidos possuem excelentes propriedades tensoativas (baixos valores de tensão superficial). As variações observadas nas propriedades tensoativas dos surfactantes obtidos se devem a diferença individual da concentração dos homólogos, uma vez que cada homólogo possui característica específica (DÉZIEL et al., 1999). Outra possibilidade para explicar as diferenças observadas é a presença de impurezas, como ácidos graxos não metabolizados extraídos do meio de cultura e que também possuem propriedades tensoativas (DÉZIEL et al., 2003).

CAPÍTULO 3 – Recuperação, caracterização e avaliação das propriedades e aplicações dos ramnolipídios obtidos da linhagem L2-1 em meio MOF.

5.3.1 - Recuperação e caracterização dos ramnolipídios

Entre os microrganismos isolados (*P. aeruginosa* L2-1, B1-3, 6c e 7a) e diferentes fontes de carbono (glicerol, óleo de fritura, manipueira e manipueira adicionada com óleo de fritura) usadas para a produção de ramnolipídios, o isolado L2-1 no meio manipueira adicionado com óleo de fritura (MOF) foi o que apresentou as maiores concentrações finais de ramnolipídios. Sendo assim, o ramnolipídio produzido pelo isolado L2-1 no meio MOF foi escolhido para a recuperação e determinação das características físico-químicas e possíveis aplicações.

A composição dos ramnolipídios após recuperação em coluna coberta com resina Amberlite XAD[®] e o ramnolipídio comercial Jeneil Biosurfactant Company (JBR599) estão na Tabela 17. Verifica-se que a composição do ramnolipídio produzido pela linhagem L2-1, chamado de Rha L2-1, e o ramnolipídio comercial produzido pela Jeneil Biosurfactant Company (JBR599) diferem na quantidade relativa (%) dos homólogos, principalmente dos dois homólogos predominantes RhaC₁₀C₁₀ e RhaRhaC₁₀C₁₀. O ramnolipídio comercial apresenta uma homogeneidade entre os homólogos predominantes, com uma porcentagem de 37,67% de RhaC₁₀C₁₀ e 33,14 % de RhaRhaC₁₀C₁₀. Já a mistura Rha L2-1 apresenta uma porcentagem de 17,18% de RhaC₁₀C₁₀ e 34,32% de RhaRhaC₁₀C₁₀ (Tabela 17). Outra variação observada entre as composições é a porcentagem total de homólogos insaturados. O ramnolipídio JBR599 apresenta um total de 7,25% de ramnolipídios insaturados e Rha L2-1 uma porcentagem total de 18,47%.

Tabela 17

Composição e quantidade relativa (%) dos ramnolipídios obtidos da Jeneil Biosurfactant Compay (JBR599) e do isolado *P. aeruginosa* L2-1 após 120 h de incubação no meio MOF e recuperação em coluna.

Ramnolipídio (%)	JBR599	L2-1
RhaC8C8	ND*	0,02
RhaC10C8	5,28	1,9
RhaC10C10	37,67	17,18
RhaC10C12	3,53	3,26
RhaC12C12	0,06	ND
RhaRhaC8C8	0,36	0,07
RhaRhaC8C10	4,33	14,47
RhaRhaC10C10	33,14	34,32
RhaRhaC10C12	4,22	10,19
RhaRhaC12C12	0,1	0,12
RhaC10C10:1	0,72	0,43
RhaC10C12:1	3,55	2,88
RhaC12C12:1	0,19	ND
RhaRhaC10C10:1	0,64	1,41
RhaRhaC10C12:1	1,88	13,75
RhaRhaC12C12:1	0,27	ND

ND* - não detectado

5.3.2 - Atividades tenso-ativas das soluções de surfactantes

A Tabela 18 mostra os valores de tensão superficial, interfacial e CMC das soluções aquosas da mistura de ramnolipídios JBR599 e da mistura produzida pelo isolado L2-1. Nota-se que as duas misturas de ramnolipídios apresentam baixos valores de tensão superficial, interfacial e CMC, e que Rha L2-1 possui um valor de CMC abaixo do que JBR599. A diferença nos valores de tensão e CMC devem-se provavelmente a diferença na composição dos homólogos presentes, da presença de insaturações, do comprimento da cadeia e do tamanho do grupo hidrofílico das misturas de ramnolipídios.

Tabela 18

Valores de tensão superficial, interfacial e CMC das misturas de ramnolipídios da Jeneil Biosurfactant Company (JBR599) e Rha L2-1.

Ramnolipídio	T. S. ¹ . (mN/m)*	T. I. ² (mN/m)*	C.M.C. (mg/l)
JBR599	29,0	1,7	100,0
L2-1	30,0	2,3	30,0

*Valores obtidos a partir da solução aquosa de surfactante na CMC.

T.S.¹ = Tensão superficial

T.I.² = Tensão interfacial

Valores similares de tensão superficial, interfacial e CMC foram descritos com misturas de ramnolipídios produzidas a partir de resíduos de refinaria de óleos vegetais (BENINCASA et al., 2002, NITSCHKE et al., 2005a), óleos vegetais (MATA-SANDOVAL et al., 1999, HABA et al., 2003, COSTA et al., 2006) e glicerol (SYLDATK et al., 1985, NITSCHKE et al., 2005a).

As propriedades dos ramnolipídios são dependentes da distribuição dos homólogos presentes. A taxa e a composição dos homólogos, a presença de insaturações, o comprimento da cadeia e o tamanho do grupo hidrofílico podem afetar as propriedades tenso-ativas (NITSCHKE et al., 2005b). O diramnolipídio RhaRhaC₁₀C₁₀ mostra um valor de CMC menor que o monoramnolipídio RhaC₁₀C₁₀, 5 e 40 mg/L respectivamente (LANG & WAGNER, 1987). Haba et al., (2003) descreveram que a mistura de ramnolipídios contendo 18,95% de insaturados (C_{12:1} e C_{14:1}) possui um CMC de 108 mg/L, sendo este valor maior do que o correspondente para as formas saturadas, sugerindo uma relação entre grau de insaturação e CMC. Um surfactante contendo altas quantidades de RhaRhaC₁₀C₁₂ e RhaRhaC₁₀C_{12:1} possui um valor de CMC de 37 mg/L e uma tensão superficial de 36 mN/m. Já o ramnolipídio contendo altas concentrações de RhaRhaC₁₀C₁₀ possui CMC de 53 mg/L e tensão superficial de 31 mN/m (MATA-SANDOVAL et al., 1999).

O ramnolipídio comercial JBR599 possui um total de 6,1% para os homólogos RhaRhaC₁₀C₁₂ e RhaRhaC₁₀C_{12:1} e Rha L2-1 uma porcentagem total de 23,94%. Já o total dos homólogos RhaRhaC₁₀C₁₀ e RhaRhaC₁₀C_{10:1} é muito semelhante para os dois ramnolipídios avaliados, 33,78% e 35,73% respectivamente. A diferença na porcentagem entre os homólogos de maior cadeia (RhaRhaC₁₀C₁₂ e RhaRhaC₁₀C_{12:1}) pode explicar a diferença entre os valores de CMC do ramnolipídio JBR599 (100 mg/L) e o Rha L2-1 (30 mg/L), uma vez que grandes cadeias de ácido graxo conferem uma maior hidrofobicidade as moléculas (MATA-SANDOVAL et al., 1999).

Surfactantes com uma baixa tensão interfacial são efetivos na mobilização de moléculas hidrofóbicas, tornando-as mais acessíveis a biodegradação. Moléculas com baixa massa molar e baixa CMC aumentam a solubilidade dos hidrocarbonetos pela incorporação destes nas cavidades hidrofóbicas das micelas (MILLER & ZHANG, 1997). O Rha L2-1 apresenta as características citadas acima, demonstrando o potencial do biosurfactante em uma variedade de aplicações industriais, como por exemplo, a biorremediação de poluentes oleosos.

5.3.3 - Atividade emulsificante

Os parâmetros físico-químicos dos ramnolipídios são influenciados pela sua composição, sendo, portanto necessário a caracterização destes para encontrar aplicações novas ou específicas. Sendo assim, a atividade emulsificante frente a compostos hidrofóbicos (benzeno, querosene e óleo de soja) foi estudada. A estabilidade da emulsão (E%) foi avaliada após 30 dias.

As Figuras 15 e 16 mostram os valores da atividade emulsificante (E24%) obtidas pelos ramnolipídios de *P. aeruginosa* L2-1 e JBR599, respectivamente, contra óleo de soja, querosene e benzeno após 24 horas. O aumento na concentração de surfactante não alterou a atividade emulsificante contra óleo de soja para os ramnolipídios da JBR599 e Rha L2-1 (Figuras 15 e 16). Contra querosene, o aumento na concentração de surfactante causou um aumento na atividade emulsificante para os dois ramnolipídios analisados, variando de 83% na concentração referente a CMC para 100% na CMC + 5% (em massa de ramnolipídio). Contra benzeno, o aumento na concentração do ramnolipídio Rha L2-1 causou um decréscimo na atividade emulsificante, variando de 80% na CMC para 62% na CMC + 5% (em massa de ramnolipídio). Já para o ramnolipídio JBR599, o aumento na concentração causou um aumento na atividade emulsificante, variando de 53% na CMC para 89% na CMC + 5% (em massa de ramnolipídio) (Figuras 14 e 15). As emulsões formadas foram do tipo óleo-água (O/A) e água-óleo (A/O).

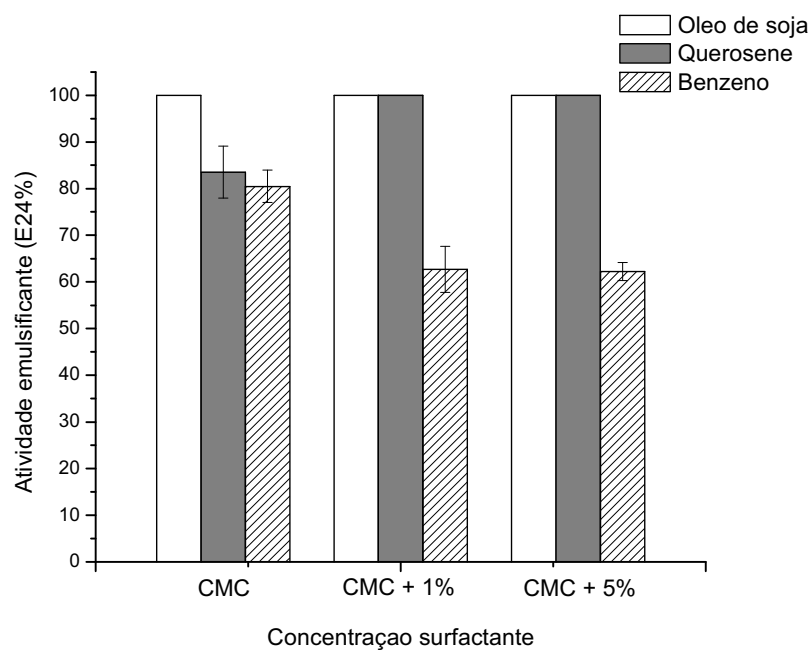


Figura 14 – Atividade emulsificante do Rha L2-1 em meio MOF contra óleo de soja, querosene e benzeno.

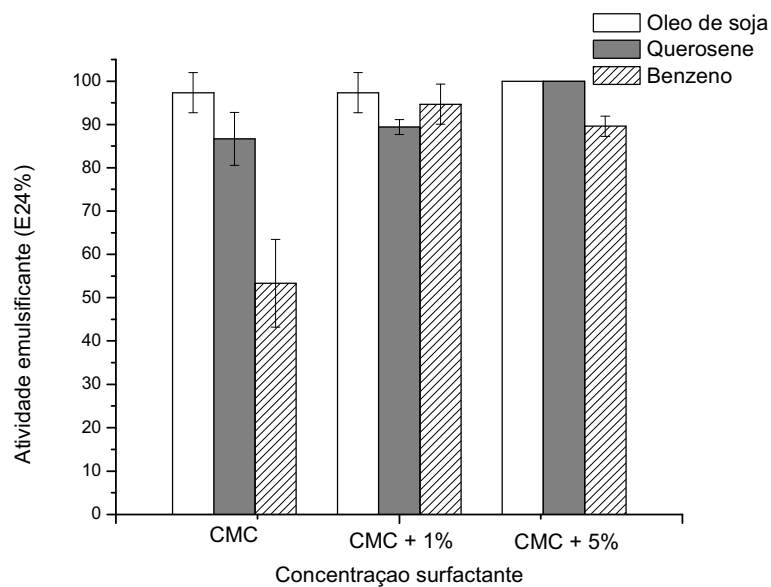


Figura 15 – Atividade emulsificante do ramnolipídio JBR599 contra óleo de soja, querosene e benzeno.

A estabilidade das emulsões foi avaliada após 30 dias (Figuras 16 e 17). Contra óleo de soja, a emulsão produzida pelo Rha L2-1 (Figura 16) se manteve 100% estável. A emulsão do ramnolipídio JBR599 (Figura 17) apresentou uma redução de 100% para 60% após 30 dias na CMC + 5% (em massa de ramnolipídio). Contra querosene, a emulsão produzida pelos ramnolipídios JBR599 e Rha L2-1 apresentaram uma redução para todas as concentrações de surfactante estudadas, decaindo de 100% para 60% após 30 dias na CMC + 5% (em massa de ramnolipídio). Não foi possível avaliar a estabilidade da atividade emulsionante contra benzeno, pois o mesmo evaporou durante o processo.

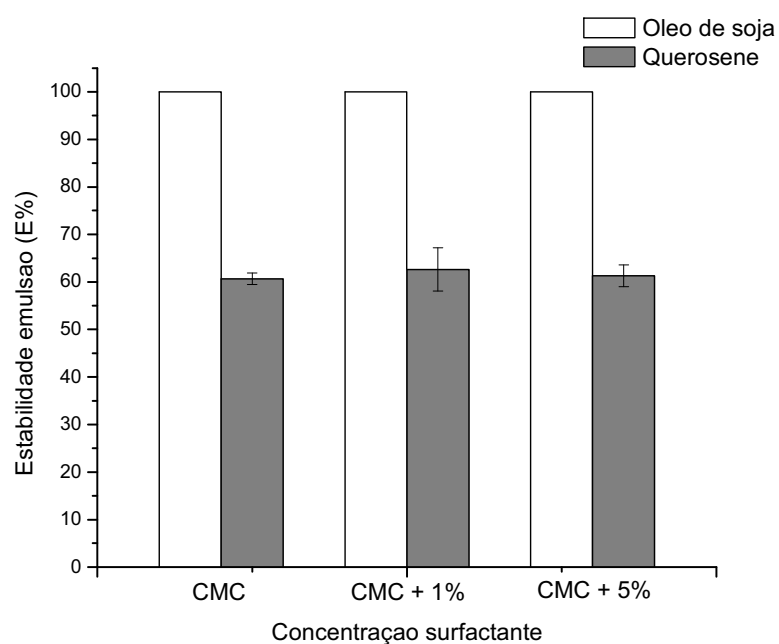


Figura 16 – Estabilidade da emulsão para o ramnolipídio produzido pelo Rha L2-1 em meio MOF após 30 dias.

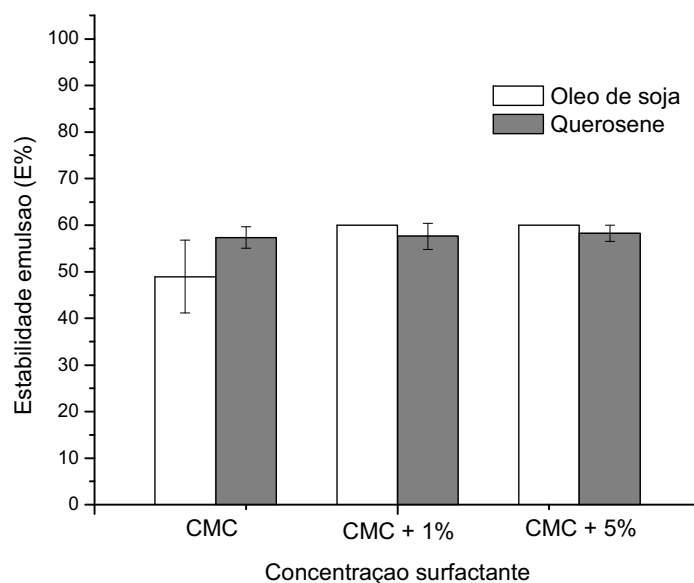


Figura 17 – Estabilidade da emulsão para o ramnolípido JBR599 após 30 dias.

O aumento da concentração do surfactante influenciou a atividade emulsionante apenas na E24%, não tendo influência na estabilidade da emulsão. Com a adição de ramnolípido na CMC (1 e 5% em massa) houve a formação de uma maior camada emulsionante, que possivelmente foi causada pela formação de um maior número de micelas, que constitui um ambiente compatível para moléculas hidrofóbicas. O processo de incorporação destas moléculas nas micelas é conhecido como solubilização (URUM & PEKDEMIR, 2004). Estes resultados revelam o excelente potencial destes compostos para uso na biorremediação de poluentes e na indústria de alimentos e cosmética como agentes emulsionantes e solubilizantes.

Os biossurfactantes podem aumentar a disponibilidade de compostos orgânicos insolúveis em água. Abaixo da CMC, o surfactante pode aumentar a disponibilidade devido a diminuição da tensão superficial. Acima da CMC, micelas e outros agregados são formados causando uma maior interação célula-substrato com conseqüente aumento da biodegradação (URUM et al., 2006).

5.3.4 - Potencial para a remediação de ambientes contaminados

O potencial para a remediação foi avaliado pela remoção do óleo cru de petróleo, da areia contaminada pelas soluções de surfactantes (Ramnolipídio JBR 599 e Ramnolipídio produzido pelo Rha L2-1 e SDS) e de água destilada.

O controle (água destilada) mostrou uma remoção total de 20% de óleo. Foi observado que o aumento na concentração de surfactante não causou aumento na remoção do óleo usando ramnolipídio JBR599 e SDS (Figura 19). Para o ramnolipídio produzido pelo Rha L2-1, o aumento na concentração de surfactante causou um aumento na remoção de óleo, passando de 69% na CMC para 84% na CMC + 5% (em massa de ramnolipídio). O máximo de remoção do óleo para SDS e para o ramnolipídio produzido pelo Rha L2-1 ocorreu na CMC + 5% (em massa de ramnolipídio) no total de 84%. Já para o ramnolipídio JBR 599 o máximo de remoção se deu na CMC, com um total de 98% de remoção (Figura 18).

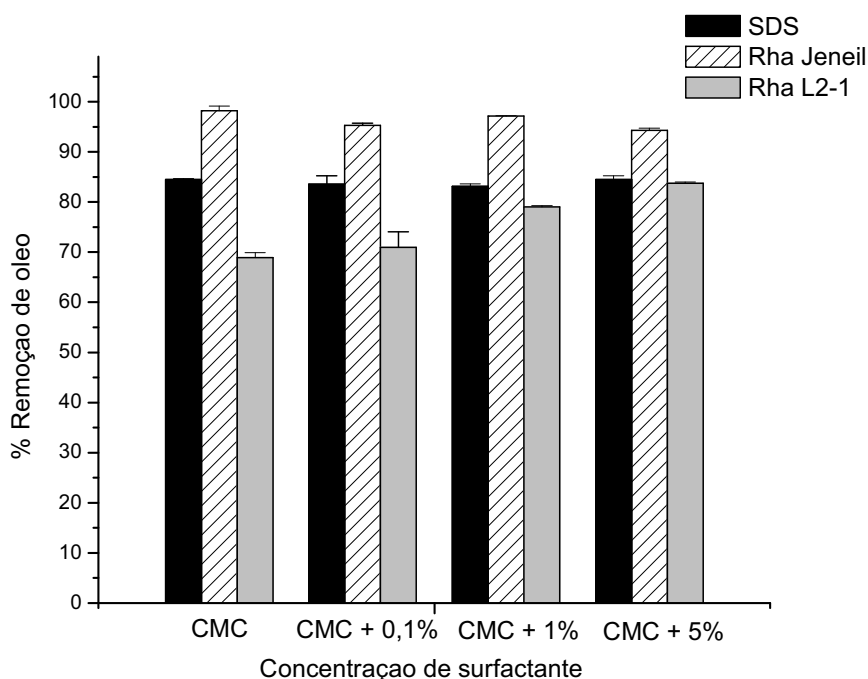


Figura 18 – Remoção de petróleo bruto de areia contaminada após o processo de lavagem.

O mecanismo de mobilização ocorre em concentrações abaixo dos valores da CMC e está associado com a redução das tensões superficial e interfacial, redução da força capilar e ângulo de contato. Acima da CMC a solubilidade do óleo aumenta drasticamente devido a formação das micelas. A porção hidrofóbica das moléculas de surfactantes se aglomera dentro da estrutura da micela e a parte hidrofílica fica exposta na fase aquosa. Consequentemente, o interior da micela se torna um ambiente compatível para moléculas hidrofóbicas, sendo que o processo de incorporação destas moléculas em micelas é conhecido como solubilização (URUM & PEKDEMIR, 2004). Sendo assim, o mecanismo de remoção de óleo pelo ramnolipídio produzido pelo Rha L2-1 foi causado principalmente pela solubilização, já que com o aumento da concentração de surfactante acima da CMC houve um aumento na remoção de óleo, devido a formação de um maior número de micelas (Figura 18). Já a remoção de óleo pelo ramnolipídio JBR599 se deve principalmente pelo mecanismo de mobilização, uma vez que com o aumento da concentração de surfactante acima da CMC não se verificou uma melhora na remoção de óleo (Figura 18).

Urum et al., (2004) estudaram a influência de diversos parâmetros (temperatura, tempo, velocidade de rotação, volume da solução e concentração de surfactante) na remoção de petróleo bruto em diferentes tipos de solo com partículas de tamanho variado, usando SDS e ramnolipídio como surfactantes. Os autores concluíram que acima da CMC houve uma maior remoção de óleo, sugerindo que a remoção ocorreu devido a solubilização da solução de surfactante entre a interface solo-óleo e diminuição da tensão interfacial. O aumento na temperatura reduziu a viscosidade do óleo, aumentando a mobilidade e sua interação com a solução de surfactante, facilitando assim a remoção. O aumento na velocidade de rotação auxiliou a remoção do óleo durante a lavagem devido ao aumento na área superficial do solo (maior contato) com a solução de surfactante. Em relação ao tempo na lavagem, quanto maior a partícula do solo mais tempo de lavagem foi necessário para a remoção. Dessa forma, vários parâmetros como concentração do surfactante, tempo de lavagem, velocidade de rotação e características físico-químicas do solo influenciam na porcentagem final de óleo removido após lavagem, explicando as diferenças encontradas com a literatura.

As Figuras 19, 20, 21 e 22 mostram a remoção do óleo na areia após lavagem pelas soluções de surfactantes e da água destilada. Já a Figura 23 mostra uma comparação de todas as soluções de surfactantes e o controle (água destilada).

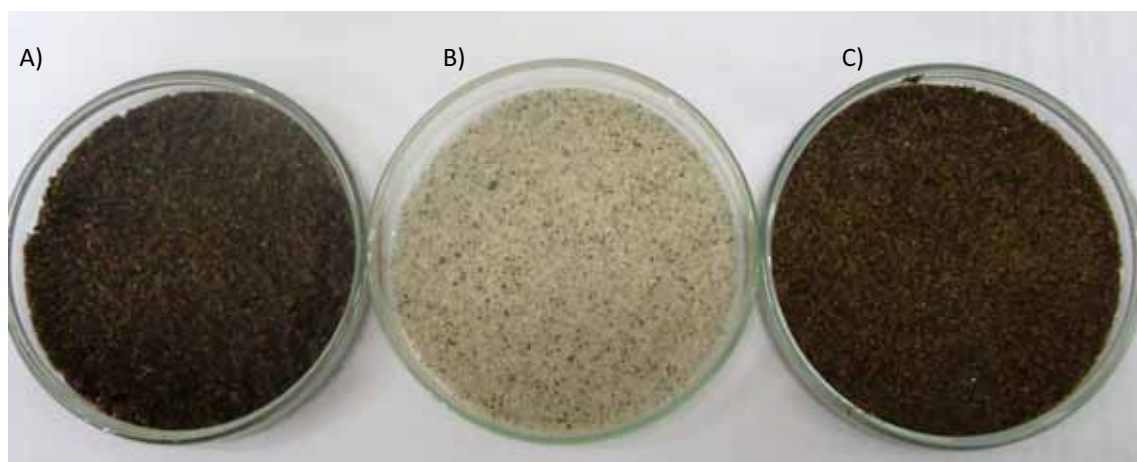


Figura 19 – Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem com água destilada.

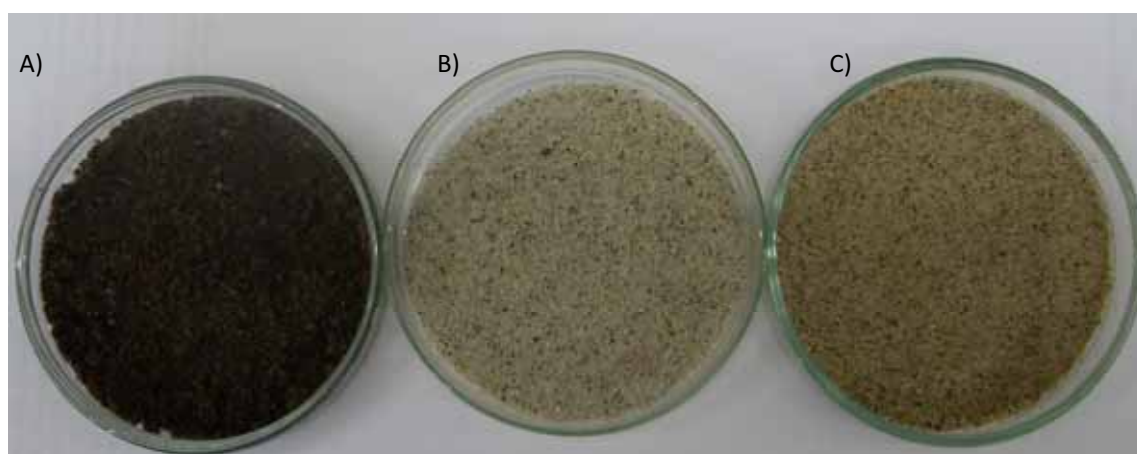


Figura 20 – Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem com solução de ramnolipídio produzido pelo Rha L2-1.

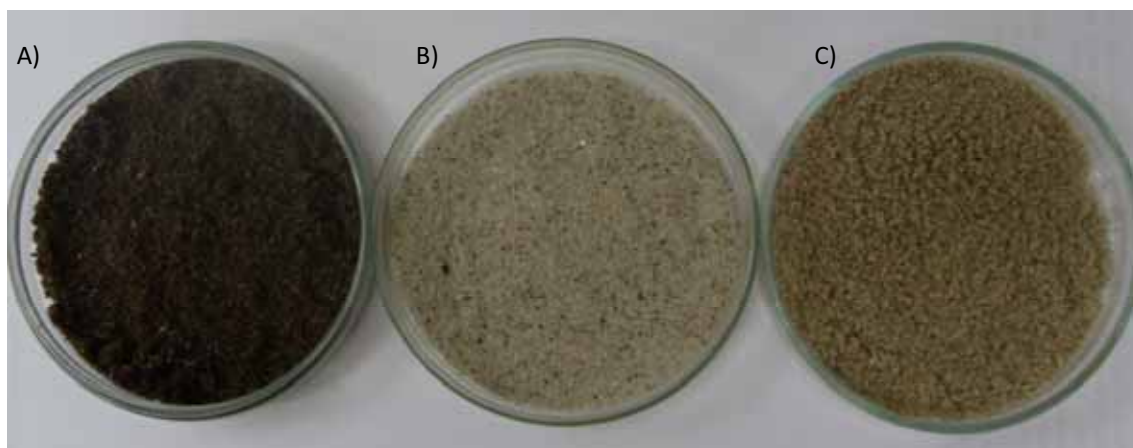


Figura 21 – Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem pela solução de ramnolipídio JBR599.

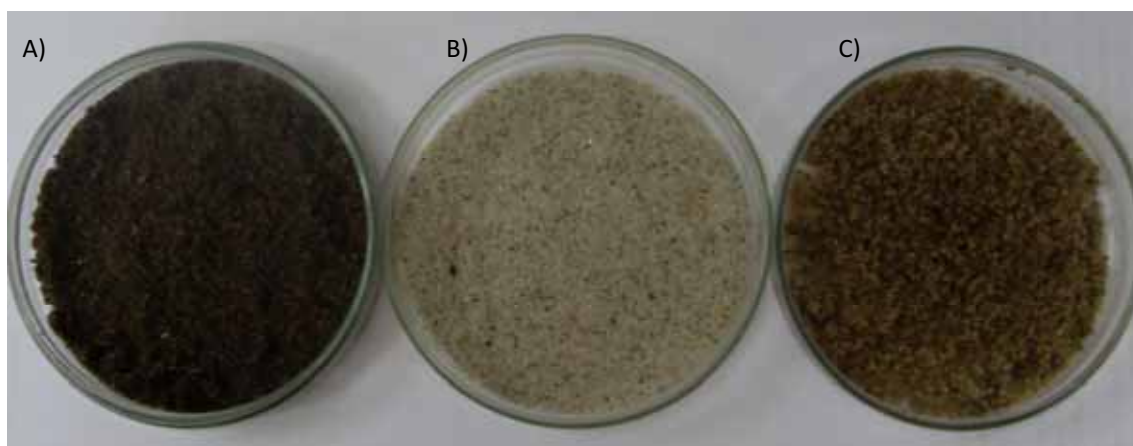


Figura 22 – Areia contaminada com petróleo bruto, antes e depois do processo de lavagem. a) areia contaminada com petróleo bruto; b) areia sem contaminação; c) areia contaminada com petróleo bruto após lavagem pela solução de SDS.

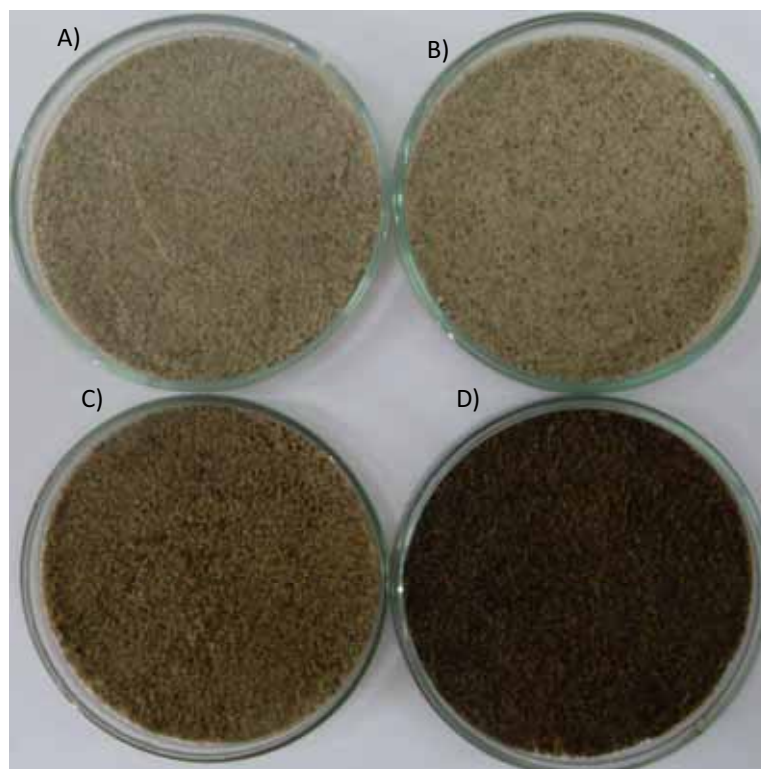


Figura 23 – Areia contaminada com petróleo bruto após processo de lavagem. a) solução de ramnolipídio produzido pelo Rha L2-1; b) solução de ramnolipídio JBR599; c) solução de SDS; d) controle (água destilada).

Formação de emulsões do tipo O/A favorecem o mecanismo de remoção do óleo em um solo contaminado devido a solubilização do óleo nas micelas de surfactantes. Entretanto, a formação de emulsões pode prejudicar a lavagem do solo, isto porque, quando formadas são relativamente imóveis e altamente viscosas, dificultando a penetração do surfactante na interface solo-óleo. Portanto, a formação de emulsão deve ser evitada no processo de lavagem do solo, mas o surfactante que apresenta uma boa atividade emulsificante deve ser selecionado para o tratamento do solo (URUM & PEKDEMIR, 2004). Durante a lavagem, no frasco contendo o ramnolipídio JBR599 houve a formação de emulsões, o que poderia prejudicar a lavagem em larga escala. Já o frasco contendo Rha L2-1 não apresentou emulsões, sendo este um bom indicativo para a utilização do mesmo no processo em escalas maiores.

Biossurfactante a partir do sobrenadante livre de células, que é uma mistura de meio fermentado contendo ramnolipídios, proteínas e residual da fonte de carbono (glicerol) foi utilizado nos processos de lavagem de solos impactados por óleo, resultando em uma redução significativa nos custos de produção, devido a eliminação das etapas de purificação e extração (ramnolipídio bruto). O uso desse biossurfactante para a remoção de óleo em solos arenosos apresentou eficácia similar à dos biossurfactantes concentrados comerciais (SANTA ANNA et al., 2007). Assim sendo, dependendo do objetivo da utilização do produto este não precisa ser purificado e extraído, reduzindo os custos de produção, como mostrado acima na remoção de óleo em solos.

A remoção do óleo apresentou pouca variação entre as soluções de surfactantes estudadas, sendo que as soluções de ramnolipídio devem ser considerada mais atrativas pois são biodegradáveis e menos tóxicas ao ambiente do que a solução de SDS. Portanto, os dados obtidos no presente estudo podem ser usados como um modelo para testes em larga escala.

5.3.5 - Simulação do efeito de exposição ao ambiente das amostras de areia contaminada por óleo por um determinado período de tempo

Os compostos do petróleo bruto variam em suas propriedades físico-químicas e durante o processo de exposição ao ambiente é esperado que diferentes frações do óleo sejam perdidas, dependendo do tempo de exposição. O processo de exposição ao ambiente faz com que os componentes mais voláteis do óleo sejam evaporados (URUM et al., 2006), como pode ser observado na Figura 24. A maioria dos compostos voláteis foi perdida durante as primeiras 72 horas (42%). Observou-se uma redução de massa do contaminante de 110 para 95 mg de óleo por grama de areia após tratamento à 50 °C. Após 14 dias de tratamento, a taxa de evaporação decaiu não sendo observado uma redução significativa da massa.

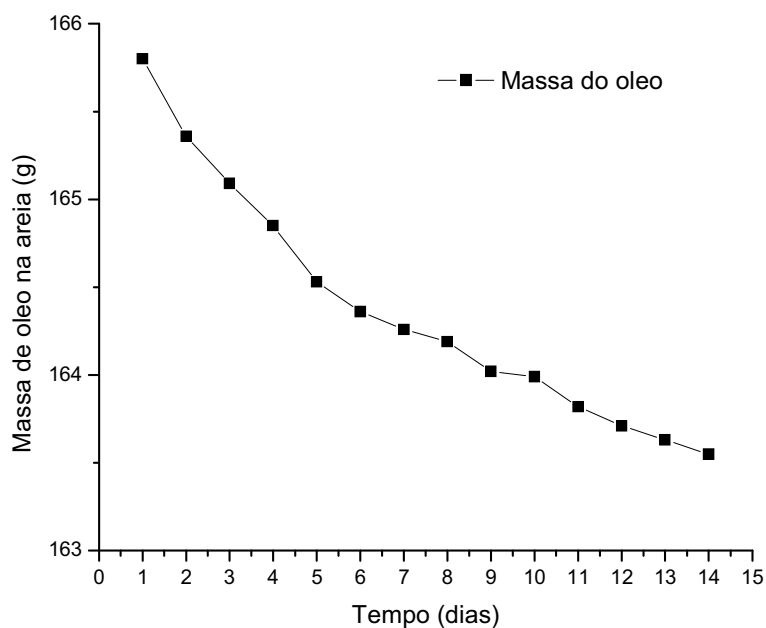


Figura 24 – Redução da massa de petróleo bruto de areia contaminada após tratamento à 50 °C por 14 dias.

Butt et al., (1986) mostraram que a evaporação causa um aumento na proporção dos componentes de alto peso molecular, resultando em um contaminante com alta viscosidade e densidade. Isso leva a uma alta ligação entre o óleo e o solo, dificultando assim a remoção pela solução de surfactante.

A solução de ramnolipídio JBR599 na CMC removeu 86,9% do óleo após tratamento da areia à 50 °C. Já a solução de ramnolipídio Rha L2-1 na CMC removeu 90,7% de óleo (Figura 25). Observa-se uma melhora na porcentagem final de remoção para esta solução após tratamento à 50 °C (69% sem tratamento para 90% com tratamento) e para o ramnolipídio JBR599 houve uma queda na porcentagem final de remoção após tratamento da areia (98% sem tratamento para 86,9% com tratamento).

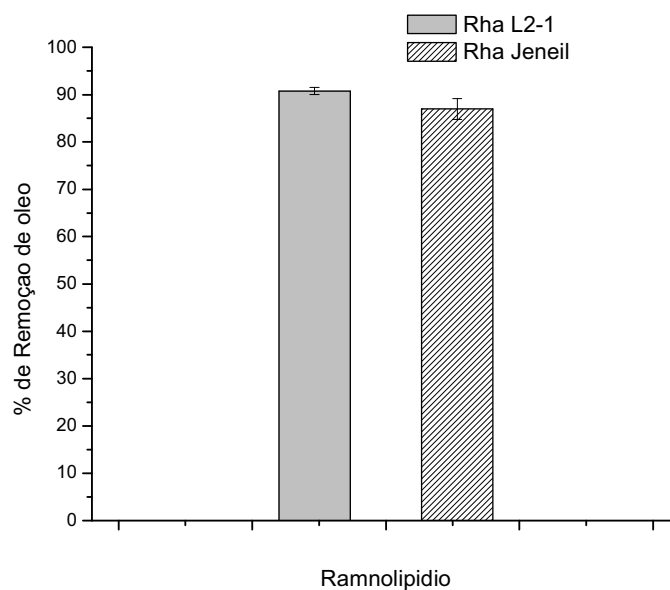


Figura 25 - Remoção de petróleo bruto em areia contaminada por soluções de ramnolipídio após tratamento da areia a 50 °C por 14 dias.

Verifica-se que Rha L2-1 possui potencial para ser usado em atividades de campo, uma vez que houve aumento na remoção de óleo após simulação do efeito de exposição ao ambiente das amostras de areia contaminada por óleo.

5.3.6 - Aderência bacteriana à hidrocarbonetos

O teste de “aderência bacteriana à hidrocarbonetos” (MATH) foi realizado com os isolados de *P. aeruginosa* (L2-1, B1-3, 7a e 6c) contra hexadecano. Os dados mostram que os microrganismos L2-1, B1-3 e 7a possuem uma baixa aderência ao hexadecano (em torno de 20%) e o microrganismo 6c uma maior aderência (Tabela 19).

Tabela 19

Hidrofobicidade celular dos isolados de *P. aeruginosa* (% de aderência ao hexadecano).

Bactérias	% de aderência ao hexadecano
<i>P. aeruginosa</i> L2-1	21,2 ± 0,4
<i>P. aeruginosa</i> B1-3	27,2 ± 4,4
<i>P. aeruginosa</i> 6c	48,5 ± 2,8
<i>P. aeruginosa</i> 7a	21,4 ± 2,5

Verificou-se também o efeito da presença e aumento da concentração de ramnolipídios na aderência celular ao hexadecano. Como pode ser visto na Figura 26, a adição de ramnolipídios na solução causou um aumento na taxa de adesão de células ao hexadecano, tornando as células mais hidrofóbicas. E o aumento na concentração de ramnolipídio está ligado com o aumento na adesão microbiana ao hidrocarboneto.

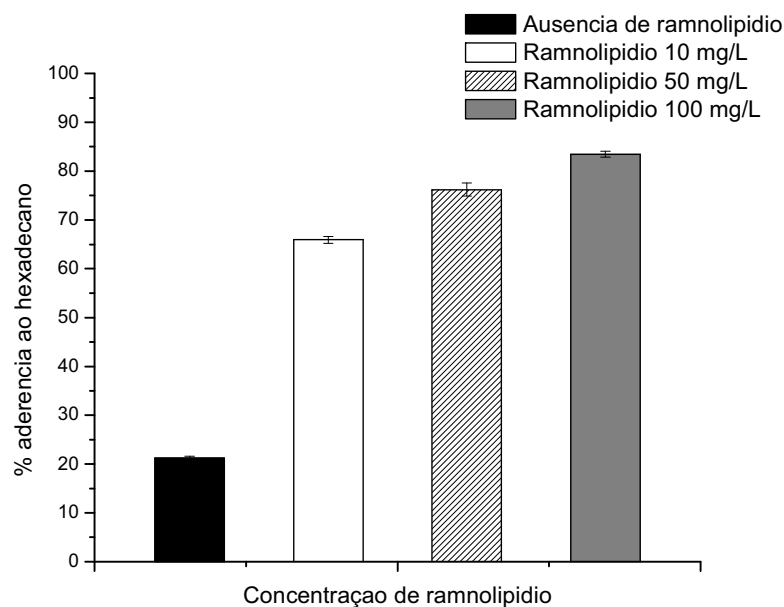


Figura 26 – Aderência celular de *P. aeruginosa* L2-1 contra hexadecano na presença de diferentes concentrações de ramnolipídio.

A habilidade de um microrganismo se ligar a uma superfície e desenvolver biofilmes tem despertado interesse de várias áreas, como medicina, indústria de alimentos e biorremediação. Vários fatores estão envolvidos na adesão celular em superfícies, incluindo micro-topografia, rugosidade e carga da superfície, transporte de massa e hidrofobicidade celular dos microrganismos (PALMER et al., 2007). Este último é de suma importância nos processos de degradação e biorremediação de hidrocarbonetos, pois permite a adesão do microrganismo no substrato.

Sotirova et al., (2009) e Al-Tahhan et al., (2000) estudaram o efeito da adição de ramnolipídios no crescimento, propriedades e mudanças na estrutura química da superfície celular de *P. aeruginosa*. Os resultados demonstraram que a adição de ramnolipídio no meio de cultura não afetou o crescimento, mas afetou significativamente os níveis de proteínas extracelulares. O aumento das proteínas extracelulares foi dependente da concentração de ramnolipídio e provavelmente estaria ligado ao aumento da permeabilidade celular. Também foi relatado que a presença de ramnolipídios acima da CMC torna a célula mais hidrofóbica, e que a hidrofobicidade celular está associada com a redução de lipolissacarídeos (LPS) de

membrana. A presença de LPS na superfície celular torna a bactéria mais hidrofílica e que a perda de LPS na superfície torna esta mais hidrofóbica. Sendo assim, o aumento na adesão ao hexadecano por *P. aeruginosa* L2-1 causado pela adição de ramnolipídio provavelmente se deu a perda de LPS de membrana.

Os ramnolipídios podem interagir com LPS em diferentes maneiras causando a remoção deste na membrana. Pode ocorrer a remoção direta do LPS por solubilização ou a remoção indireta do LPS através da complexação do Mg^{+2} na membrana externa. O magnésio é um metal essencial para a manutenção das interações LPS-LPS da membrana externa e a sua remoção causa uma desestabilização desta interação e consequente perda dos LPS de membrana. Sendo que este mecanismo é apoiado pelo fato que o ramnolipídio forma um complexo divalente com metais, como o magnésio (AL-TAHHAN et al., 2000).

Assim sendo, os ramnolipídios podem atuar na degradação de compostos hidrofóbicos (biorremediação) de duas diferentes formas. Podem solubilizar compostos hidrofóbicos devido a formação de micelas, aumentando a solubilidade do composto orgânico e sua disponibilidade para célula, ou então, podem causar alterações na superfície celular, tornando-a mais hidrofóbica, aumentando assim o contato direto entre a célula e o substrato.

5.3.7 - Toxicidade frente ao fenol

Células de *P. aeruginosa* L2-1 foram mantidas em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono e energia. O fenol foi adicionado em diferentes concentrações durante a fase exponencial de crescimento. Após uma hora de exposição ao fenol, o microrganismo continuou em fase exponencial, mas reduziu as taxas de crescimento. Com uma concentração acima de 0,03 mol/L de fenol e após duas horas de contato com o composto tóxico, as células entraram na fase estacionária.

O ramnolipídio adicionado no meio de cultivo não afetou o crescimento celular de *P. aeruginosa* L2-1. Calculando as taxas de crescimento de todas as culturas e comparando com a cultura controle foi possível plotar o crescimento relativo na presença do fenol em diferentes concentrações e na presença do ramnolipídio. Como pode ser observado na Figura 27, a

presença de ramnolipídio no meio de cultura reduziu o efeito da toxicidade do fenol, aumentando a E50% do microrganismo de 0,039 mol/L para 0,043 mol/L.

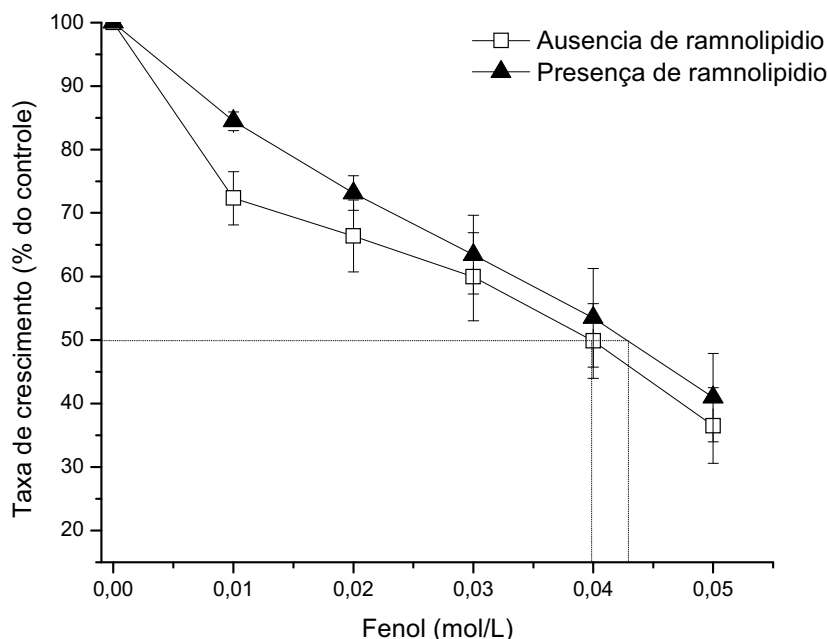


Figura 27 – Inibição do crescimento de *P. aeruginosa* L2-1 na presença e ausência de ramnolipídios. A linha marca o valor da E50% (concentração que causa 50% da inibição no crescimento) para o fenol.

A presença de ramnolipídios no meio de cultivo causou uma redução na biodisponibilidade do fenol para a bactéria, sendo que este fenômeno pode ser explicado pela formação de micelas e a ligação destas com o fenol, levando a uma redução na quantidade dissolvida do fenol no meio de cultivo e consequente aumento na E50% (CHRZANOWSKI et al., 2009).

O principal alvo de compostos orgânicos tóxicos em células procarióticas e eucarióticas é a membrana celular. Estes compostos causam uma maior fluidez na membrana, levando a uma permeabilização específica. Uma importante reação adaptativa da bactéria contra a toxicidade destes compostos é a mudança na composição dos ácidos graxos das membranas lipídicas (HEIPIEPER et al., 1995). É conhecido que a adição de ramnolipídio no

meio de cultura pode alterar significativamente os níveis de proteínas extracelulares e de LPS de membrana, causando uma alteração na permeabilidade celular (AL-TAHHAN et al., 2000; SOTIROVA et al., 2009). Sendo assim, uma outra razão no aumento da E50% causada pela adição de ramnolipídio foi possivelmente a alteração nos componentes da membrana celular, levando a uma alteração na permeabilidade do fenol.

Células de *P. aeruginosa* são frequentemente encontradas em solos, água, plantas e animais, sendo altamente tolerantes a uma variedade de condições físicas e possuindo uma resistência relativa a agentes antimicrobianos, o que contribuiu para o seu sucesso ecológico e seu papel como um organismo patogênico oportunista (GALES et al., 2001). O ramnolipídio possui um papel fundamental para a colonização de novos nichos ecológicos nas espécies de *P. aeruginosa*, uma vez que pode atuar na diminuição da toxicidade de agentes antimicrobianos, aumentar a disponibilidade de substratos hidrofóbicos para a célula, alterar a superfície celular e também atuar como uma agente antimicrobiano a uma variedade de microrganismos.

5.3.8 - Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos ramnolipídios foi estimada através dos valores de MIC 50% (concentração inibitória mínima) definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano em 50%. Para o teste foram utilizadas bactérias Gram + e Gram -. A Tabela 20 mostra os valores de MIC 50% obtidos contra as bactérias. Observou-se atividade inibitória contra *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, para Rha L2-1 e atividade inibitória contra *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus* para o ramnolipídio JBR599. Os resultados obtidos sugerem que os ramnolipídios testados são mais efetivos contra bactérias Gram-positivas, pois, dentre as linhagens Gram-negativas testadas nenhuma apresentou sensibilidade.

Tabela 20

Concentração inibitória mínima 50% (MIC 50%) do ramnolipídio JBR599 e Rha L2-1.

Microorganismo / Ramnolipídio	MIC ₅₀	
	Jeneil JBR599	L2-1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	>256	128
<i>Escherichia coli</i>	>256	>256
<i>Bacillus cereus</i>	32	32
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698	32	32
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC29004	>256	>256
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC6938	>256	>256
<i>Salmonella entero</i> ATCC13076	>256	>256

Contra *B. cereus* os ramnolipídios JBR599 e Rha L2-1 apresentaram ação bactericida, já contra *M. luteus* e *S. aureus* a ação foi bacteriostática.

Benincasa et al., (2004) utilizando ramnolipídios produzidos pela linhagem *P. aeruginosa* LBI a partir de resíduos da produção de óleo de soja encontraram que a ação foi mais efetiva contra bactérias Gram positivas do que contra Gram negativas. O MIC encontrado foi de 8 µg/mL para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*; 4 µg/mL para *Streptococcus faecalis* e 32 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. Abalos et al., (2001) relataram que os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* AT10 mostraram atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella thyphimurium* entretanto, o composto apresentou maior espectro de ação inibitória contra bactérias Gram-positivas como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* (64 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (8 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (128 µg/mL) e *Streptococcus faecalis* (64µg/mL). Nitschke et al., (2009) mostraram que o ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* LBI possui

atividade antimicrobiana contra *B. cereus* (64 µg/mL) e *Mucor miehei* (64 µg/mL) e uma pequena inibição em *Neurospora crassa*, *S. aureus* e *Micrococcus luteus* (256 µg/mL).

A variação observada nos resultados obtidos no presente estudo e os relatados na literatura são devidos a diferença na composição das misturas de homólogos dos ramnolipídios avaliadas. Devido as propriedades intrínsecas dos ramnolipídios, os compostos tenso-ativos interferem com as superfícies celulares causando uma disrupção da membrana celular (NITSCHKE et al., 2009).

Embora existam poucos relatos de atividade antimicrobiana de ramnolipídios observa-se que o perfil é semelhante, ou seja, maior ação contra bactérias Gram-positivas. A atividade antimicrobiana apresentada pelos compostos testados sugere possibilidade de aplicação em diversos campos da indústria de alimentos e cosméticos onde além das propriedades emulsionantes a atividade antimicrobiana pode ser muito vantajosa, pois estes podem também ser utilizados como agentes conservantes.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do total de 21 culturas isoladas, 2 microrganismos foram capazes de crescer e produzir ramnolipídios e PHAs no meio de cultivo proposto. Os microrganismos foram identificados e caracterizados como sendo *Pseudomonas aeruginosa*, recebendo a seguinte terminação: *P. aeruginosa* L2-1 e *P. aeruginosa* B1-3.

As linhagens de *P. aeruginosa* utilizadas neste estudo foram capazes de produzir ramnolipídios e PHAs a partir de manipueira, óleo de fritura e glicerol como substratos. Os resultados apresentados mostram que a composição dos ramnolipídios e PHAs variou de acordo com a fonte de carbono e com a linhagem utilizada. A linhagem L2-1 crescendo em manipueira adicionada com óleo de fritura apresentou os melhores resultados quando comparados com os outros substratos. Além de ser uma solução do ponto de vista ambiental e também agregar valor a estes resíduos, a manipueira adicionada com óleo de fritura pode reduzir os custos de produção permitindo a obtenção concomitante de ramnolipídios e PHAs.

Além da caracterização completa dos ramnolipídios e PHAs pelas linhagens isoladas foi feito também o perfil de produção das enzimas lipase e esterase que ajudaram a elucidar a ação dos biossurfactantes quando os microrganismos estão expostos a substratos hidrofóbicos. Ficou evidenciado que no substrato manipueira adicionado com óleo de fritura os ramnolipídios participam da solubilização e conseqüente captação de substratos hidrofóbicos para os microrganismos. Já no substrato óleo de fritura a lipase e esterase atuam na degradação do óleo em ácidos graxos e glicerol, sendo que a maioria da produção de ramnolipídios ocorre após o consumo de grande parte do substrato, não tendo assim um papel fundamental na solubilização do óleo.

O PHA é produzido durante a fase exponencial de crescimento, já o ramnolipídio durante a fase estacionária, ocorrendo então uma produção simultânea destes dois compostos.

A manipueira se mostrou um substrato alternativo com potencial para a produção de ramnolipídios e PHAs, principalmente quando adicionada com óleo de fritura. A técnica utilizada neste trabalho (HPLC/MS) foi capaz de caracterizar e quantificar os ramnolipídios produzidos pelas linhagens neste substrato.

O ramnolípido produzido pela linhagem *P. aeruginosa* L2-1 no substrato manipueira adicionado com óleo de fritura apresentou excelentes propriedades tenso-ativas além de potencial para uso na remediação de ambientes contaminados, possuindo características semelhantes e algumas vezes melhores que o ramnolípido comercial JBR599 (Jeneil Biosurfactant Co.).

7 – CONCLUSÕES

- Entre os meios avaliados, o meio manipuladora adicionado com óleo usado apresentou-se como o melhor substrato para a produção concomitante de ramnolipídios e PHAs;
- O PHA é produzido durante a fase exponencial e o ramnolipídio durante a fase estacionária de crescimento;
- O ramnolipídio auxilia a dispersão e solubilização de substratos imiscíveis;
- As enzimas lipase e esterase são dependentes do substrato hidrofóbico para a síntese;
- A presença de insaturação na fonte de carbono está ligada com o aumento no nível da proporção de duplas ligações dos monômeros de PHAs;
- A presença de insaturação na fonte de carbono não está ligada com a proporção dos ramnolipídios insaturados;
- A técnica LC/MS utilizando ionização do tipo “electrospray” usada neste trabalho permitiu a obtenção completa do perfil das misturas de ramnolipídios sintetizados por *P. aeruginosa*;
- O ramnolipídio produzido pela linhagem *P. aeruginosa* L2-1 no substrato manipuladora adicionado com óleo de fritura foi recuperado e apresentou excelentes propriedades tenso-ativas, conferindo características semelhantes e algumas vezes melhores que o ramnolipídio comercial JBR599 (Jeneil Biosurfactant Co.).

8 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados e conclusões mostrados neste trabalho nos permitiu chegar a algumas perspectivas, ou seja, novos trabalhos que poderão ser gerados futuramente e que estão detalhados nos itens a seguir:

- Produção concomitante de ramnolipídios e PHAs de *P. aeruginosa* no substrato manipueira adicionado com óleo usado em biorreator com consequentemente otimização dos parâmetros de fermentação, visando o aumento de produção dos compostos;
- Estudo de novos métodos de extração e recuperação dos ramnolipídios com o intuito do decréscimo do preço final do produto;
- Estudar as principais propriedades e aplicações dos PHAs produzidos;
- Utilização do ramnolipídio produzido pelo isolado L2-1 em atividades de campo para a lavagem de solos contaminados por hidrocarbonetos.

9 - REFERÊNCIAS

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

ACOSTA, E., TRAN, S., UCHIYAMA, H., SABATINI, D.A., HARWELL, J.H. Formulating chlorinated hydrocarbon microemulsions using linker molecules. **Environ. Sci. Technol.** v.36, p.4618-4624, 2002.

AL-TAHHAN, R.A., SANDRIN, T.R., BODOUR, A.A., MAIER, R.M. Rhamnolipid-induced removal lipolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3262-3268, 2000.

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

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

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, 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* production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technol.** v.99, p.3843-3849, 2008.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C., FRANKENBERGER JR., W.T. Diversity of biosurfactants producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbial Reserch**, v. 160, p. 249-255, 2005.

Bergey's Manual of determinative Bacteriology 9^o ed., 1994. Williams and Wilkins, Baltimore.

BODOUR, A.A.; DRESS, K.P.; MAIER, R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.3280-3287, 2003.

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

BOLES, B.R.; THOENDEL, M.; SINGH, P.K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 57, p. 1210-1223, 2005.

BRANDL, H., KNEE, E.J., JR. FULLER, C.R. Ability of phototropic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. **Int. J. Biol. Macromol.** v.11, p.49-55,1989.

BUTT, J.A., DUCKWORTH, D.F., PERRY, S.G. (Eds.), 1986. Characterization of Spilled Oil Samples: Purpose, Sampling, Analysis and Interpretation. Institute of Petroleum. John Wiley & Sons, New York.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme condicions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p.520-529, 1998.

CEREDA, M.P. Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil. São Paulo, **Paulicéia**, 1994, 174p.

CHANDRASENKARAN, E.V.; BEMILLER, J.N. Constituint analysis of glycosaminoglycans. **In: Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.III, Academic Press, Nova York, p. 89-96, 1980.

CHILDS, J.D., ACOSTA, E., SCAMEHORN, J.F., SABATINI, D.A. Surfactant-enhanced treatment of oil-based drill cuttings. **J. Energy Resour. Technol.** v.127, p.153–162, 2005.

CHRZANOWSKI, L., WICK, L.Y., MEULENKAMP, R., KAESTNER, M., HEIPIEPER, H.J. Rhamnolipids biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to *Pseudomonas putida* DOT-T1E. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.756-762, 2009.

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

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

DAMASCENO S, CEREDA MP, PASTORE GM, OLIVEIRA, J.G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochem.** v.39, p.411–414, 2003.

DAVEY, M.E.; CAIAZZA, N.C.; O'TOOLE, G.A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1027-1036, 2003

DEAN, S.M.; JIN, Y.; CHA, D.K.; WILSON, S.V.; RADOSEVICH, M. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenathrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. **J. Environ. Qual.**, v. 30, p. 1126-1133, 2001.

DEL BIANCHI, V. **Balço de massa e de energia do processamento de farinha de Mandioca em uma empresa de médio porte de São Paulo**. Botucatu, 1998. 118p. Tese de doutorado em Agronomia, Faculdade de Ciências agronômicas-UNESP.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **C.R. Chimie**, v.7, p.641-646, 2004.

DESAI, J.D.; DESAI, A.J. Production of Biosurfactants. In: N. Kosaric. Biosurfactants: Production, properties, applications, p. 65-97. New York, Marcel Decker, 1993.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Rev.**, 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, p.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, p.145-152, 2000.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S. VILLEMUR, R. *rhlA* is required for the roduction of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, p. 2005-2013, 2003.

EGGINK, G., de WAARD, P., HUIJBERTS, G.N.M. The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxyalkanoate) formation in *Pseudomonas putida*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.103, p.159-164, 1992.

FAO (2005) Food agricultural organization—statistical—database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available at: <http://www.fao.org>

FERNÁNDEZ, D., RODRIGUES, E., BASSAS, M., VIÑAS, M., SOLANAS, A.M., LLORENS, J., MARQUES, A.M., MANRESA, A. Agro-industrial oily wastes as substrate

for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: effects of culture conditions. **Biochem. Eng. J.** v.26, p.159-167, 2005.

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

GALES, A.C., JONES, R.N., TURNIDGE, J., RENNIE, R., RAMPHAL, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular type in global SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.146-155, 2001.

GARCÍA-JUNCO, M., DE OLMEDO, E., ORTEGA-CALVO, J.J. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL) dissolved phenatrene to the biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. **Environm. Microbiol.**, v.3, p.561-569, 2001.

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

HABA, E.; ABALOS, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, A. Use of liquid chromatography- mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Surf. Deterg**, v.6, p.155-161, 2003.

HABA, E., VIDAL-MAS, J., BASSAS, M., ESPUNY, M.J., LLORENS, J., MANRESA, A. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): effects of nutrients and incubation temperature on polymer composition. **Biochem. Eng. J.** v.35, p.99-106, 2007.

HARTMANN, R., HANY, R., PLETSCHER, E., RITTER, A., WITHOLT, B., ZINN, M. Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: batch versus chemostat production. **Biotechnol Bioeng** v.93, p.737–746, 2006.

HARVEY, S., ELASHI, I., VALDES, J.J., KAMELY, D., CHAKRABARTY, A.M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. **Biotechnology**, v.8, p. 228-230, 1990.

HAUBLER, S.; ROHDE, M.; VON NEUHOFF, N.; NIMTZ, M.; STEIMETZ, I. Structural and functional cellular changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2970-2975, 2003.

HEIPIEPER, H.J., LOFFELD, B., KEWELOH, H. AND DE BONT, J.A.M. The cis / trans isomerization of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indicator for environmental stress due to organic compounds. **Chemosphere** v.30, p.1041–1051, 1995.

HESTER, A. I. B. Market forecast. **Ind. Bioprocessing** v.23, p.3, 2001.

HOCKING, J.; MARCHESSAULT, R.H. Biopolyesters, in: G.F.L. Griffin (Ed.), Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers, Chapman and Hall, London, 1994, pp. 48–96.

HORI, K., MARSUDI, S., UNNO, H. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnol. Bioengin.** v.78, p.699-707, 2002.

IQBAL, S.; KHALI, 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 Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.

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

KILCAWLEY, K.N., WILKINSON, M.G., FOX, P.S. Determination of key enzymes activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. **Enzyme Microbial. Technol.** v.31, p.310-320, 2002.

KIM, P.I.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **J. Applied Microbiology**, v. 97, p. 942-949, 2004.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal Laboratory of Clinic Medical**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KOLLER, M., BONA, R., CHIELLINI, E., FERNANDES, E.G., HORVAT, P. KUTSCHERA, C., HESSE, P., BRAUNNEG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. **Bioresource Technol.** v.99, p.4854-4863, 2008.

LANG, S.; WAGNER, F. In: *Biosurfactants and Biotechnology*, N. Kosaric *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, New York (1987) pp. 21–45.

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

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p.109-120, 1996.

MADISON, L.L., HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.63, p.21-53, 1999.

MAIER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-121, 2003

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

MAROSTICA, M.R. JR., PASTORE, G.M. Production of *R*-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava wastewater as medium. **Food Chem** v.101, p.345–350, 2007.

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

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.** v.155, p.249-256, 2001.

MEAD, G.C.; ADAMS, B. W. A selective medium for the rapid isolation of *Pseudomonas* associated with poultry meat spoilage. **Br. Poult. Sci.** v.18, p.661 – 670, 1977.

MERCADÉ, M.E.; DE ANDRES, M.C.; RONDON, I.; MARTINEZ, F.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A. Screening and selection of surfactants producing bacteria from waste lubricating oil. **J. Appl. Bacteriol.** v.81, p.161-166, 1996.

MEYLHEUC, T.; METHIVIER, C.; RENAULT, M.; HERRY, J.M.; PRADIER, C.M.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, p. 128-137, 2006.

MILLER, R.M., ZHANG, Y. Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. **Methods Biotechnol.** v.2, p. 59-66, 1997.

MUELLER, J.G.; DEVEREUX, R.; SANTAVY, D.L.; LANTZ, S.E.; WILLIS, S.G.; PRITCHARD, P.H. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 329-343, 1997.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of a contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v.60, p. 371-380, 2001.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.106, p. 295-302, 2003.

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

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

NITSCHKE M., PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresour Technol** v.97, p.336–341, 2006.

NITSCHKE, M., COSTA, S.G.V.A.O., CONTIERO, J. (2009). Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in a soybean oil waste. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, DOI 10.1007/s12010-009-8707-8.

O'CONNOR, L. Market forecast: microbial biosurfactants. **Ind. Bioprocessing**, v.24, p.10-11, 2002.

ORTS, W.J., NOBES, G.A., KAWADA, J., NYUYEN, S., YU, G., RAENELLE, F. Polyhydroxyalkanoates: Biorefinery Polymers with a Whole Range of Applications. The work of Robert H. Marchessault. **Canadian Journal of Chemistry**. v.86, p.628-640. 2008.

PALMER, J., FLINT, S., BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.577-588, 2007.

PASTWESKI, S., HALLMANN, E., MEDRZYCKA, K. Physicochemical aspects of the surfactants and biosurfactants in soil remediation. **Environmental Engineering Sciences**, v.23, p.579-588, 2006.

PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. – PETROBRAS (BRASIL/RJ). Lídia Maria Mello Santa Anna et al. Biosurfatante e uso do mesmo em remediação de solos impactados por óleo. PI 0405952-2 A, 29/12/2004.10/07/2007.

PHAM, T.H., WEBB, J.S., REHM, B.H.A. The role of polyxydroxyalkanoates biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**. v.150, p.3405-3413, 2004.

PORNSUNTHORNTAWEE, O., WONGPANIT, P., CHAVADEJ, S., ABE, M., RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technol.**, v.99, p.1589-1595, 2008.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R. BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnol. Prog.**, v.18, p. 1277-1281, 2002.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. **Acta Biotechnol.**, v. 23, p. 335-345, 2003.

REHM, B.H.A., STEIBUCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.25, p.3-19, 1999.

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

ROSENBERG M, GUTNICK D & ROSENBERG E. Adherence of bacteria to hydrocarbons. A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiol Lett** v.9, p.29–33, 1980.

ROSENBERG M., ROSENBERG, E. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. **Journal of Bacteriology**, v.148, p.51-57, 1981.

ROSENBERG, E.; Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets. **Trends Biotechnol.**, v. 11, p. 419-424, 1993.

RUSSELL, D.L., 1992. Remediation Manual for Petroleum-Contaminated Sites, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA., USA.

SANDRIN, C., PEYPOUX, F., MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v.12, p.370–375, 1990.

SANIBAL, E. A.A & FILHO, J. M. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas**, 1999.

SANTA ANNA, L. M. M., SORIANO, A. U., GOMES, A. C. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil”, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** v. 82, n. 7, p. 687-691, 2007.

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

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

SILVA-QUEIROZ, S.R., SILVA, L.F., PRADELLA, J.G.C., PEREIRA, E.M., GOMEZ, J.C.G. PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **Journal of Biotechnology**. v.143, p.111-118, 2009.

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, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Applications aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.

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

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**. v. 18, p. 84-95, 2007.

SOTIROVA, A., SPASOVA, D., VASILEVA-TONKOVA, E., GALABOVA, D. Effects of rhamnolipids on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Research**, v.164, p.197-203, 2009.

STEINBUCHER, A., LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**. v.16, p.81-96, 2003.

STRAUBE, W.L.; NESTLER, C.C.; HENSEN, L.D.; RINGLEBERG, D.; PRITCHARD, P.J.; JONES-MEEHAN, J. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. **Acta Biotechnol.**, v. 23, p. 179-196, 2003.

SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.** v.25, p.1503-1555, 2000.

SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R., NARINE, S., MOLONEY, M., SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. **Biotechnology Advances**, v.25, p.148-175, 2007.

SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp. DSM 2874 grown on alkanes. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.40, p.51-60, 1985.

TAN, I.K.P., SUDESH KUMAR, K., THEANMALAR, M., GAN, S.N., GORDON III, B. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.47, p.207-211, 1997.

THIMON, I.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis* with inorganic cations. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, p. 713-718, 1992.

URUM, K., PEKDEMIR, T., COPUR, M. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. **Process Safety Environ. Protect.** v.81, p. 203–209, 2003.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v.57, p.1139-1150, 2004.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **J. Colloid and Interface Science**, v.276, p.456-464, 2004.

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

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects Part1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, STOIMENOVA, E.; LALCHEV, Z. Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake. **Microbial Research** v.163, p.481-486, 2006.

WILLIAMS, S.F.; MARTIN, D.P.; HOROWITZ, D.M.; PEOPLES, O.P. PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.25, p. 111-121, 1999.

WOHLFARTH, S.; WINKLER, U.K.; Chromosomal mapping and cloning of the lipase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. General Microbiology**, v.134, p.433-440, 1988.

WOODS, G.L.; WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility test: dilution and disk diffusion methods. In **Manual of Clinical Microbiology**, Murray, P.R. Ed., ASM Press, Washington D.C., p. 1327-1341, 1995.

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

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

10 – ANEXO 1

11.1 - Artigos publicados

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**. v.18, p.252-259, 2007.

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

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28 (1), 34-38, 2008.

COSTA, S.G.V.A.O., LEPINE, F., MILOT, S. DEZIEL, E., NITSCHKE, M., CONTIERO, J. Cassava wastewater as substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.1063-1072, 2009.

NITSCHKE, M., ARAÚJO, L.V., COSTA, S.G.V.A.O., PIRES, R.C., ZERAIK, A.E., FERNANDES, A.C.L.B., FREIRE, D.M.G., CONTIERO, J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. **Letters in Applied Microbiology**. v.49, p.241-247, 2009.

COSTA, S.G.V.A.O., SOUZA, R.S., NITSCHKE, M. FRANCHETTI, S.M.M., JAFELICCI JR., M., LOVAGLIO, R.B., CONTIERO, J. Wettability of aqueous rhamnolipids solutions

produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Journal Surfactants and Detergents.** v.12, p.125-130, 2009.