



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYARA DE ALENCAR ALMEIDA

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR BIOFILME DE
Pseudomonas aeruginosa

Londrina
2018

MAYARA DE ALENCAR ALMEIDA

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR BIOFILME DE
Pseudomonas aeruginosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Josiane Alessandra Vignoli.

Coorientador: Prof. Dr. Doumit Camilios-Neto.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Almeida, Mayara de Alencar .

Produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* / Mayara de Alencar Almeida. - Londrina, 2018.
126 f. : il.

Orientador: Josiane Alessandra Vignoli.

Coorientador: Doumit Camilios-Neto.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Ramnolipídeos - Tese. 2. Biofilme - Tese. 3. B – galactosidase - Tese. 4. *Pseudomonas aeruginosa* - Tese. I. Vignoli, Josiane Alessandra . II. Camilios-Neto, Doumit . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . IV. Título.

MAYARA DE ALENCAR ALMEIDA

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR BIOFILME DE
Pseudomonas aeruginosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, como requisito parcial ao título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Doumit Camilios-Neto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Paula Cristina de Sousa Faria Tischer
Indústria de Produtos Farmacêuticos e
Biotecnológicos Ltda - IPFB

Londrina, 28 de fevereiro de 2018.

Aos meus pais e ao meu irmão, que sempre me apoiaram e incentivaram na busca pela realização dos meus sonhos; e aos meus orientadores, por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Josiane Alessandra Vignoli, pela oportunidade, orientação, carinho, paciência, amizade e suporte em todos os momentos.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Doumit Camilios Neto, pela paciência, ensinamentos e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza (UFPR) por ceder o seu laboratório para a realização de etapas deste trabalho.

À Professora Dra. Lucélia Donatti (UFPR) e ao Laboratório De Microscopia Eletrônica e de Microanálise – LMEM da Universidade Estadual de Londrina pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À Dra Paula Tischer pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos professores do curso pelos ensinamentos que oportunizaram de algum modo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez, pela dedicação e auxílios durante a rotina de laboratório.

Aos meus pais, Maristela Alencar e Sidney Almeida, e irmão, Gabriel Almeida, pelo amor, paciência, incentivo e apoio incondicional.

Aos colegas de laboratório pela amizade, conversas, apoio, parceria e troca de experiências e conhecimentos, em especial Karen Stefany, Nicole Pan, Dayane Vanzela, Juliano Brisola, Paloma Velasco, Karina Milani, Monica Yorlady, Isadora Cernach e Leandro Afonso. Obrigada por tornarem essa caminhada mais leve.

Às estagiárias Isadora Sawoniuk e Monique Moleiro, pelo auxílio, companheirismo, conversas, e sobretudo amizade. Vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial Mariana Beleze, Maíra Frederico, Carmem Miranda, Daniela Rejan, Laís Machado, Dara Medeiros, Paula Golono, Julia Biral, Manoel Neto e Junior Hocama. Obrigada por ouvirem meus desabafos, compreenderem a minha ausência, pelo incentivo e por tornarem os meus dias mais leves e divertidos.

Ao meu namorado Victor Lucas, por compreender a minha ausência, por me acalmar nos momentos difíceis, e por todo apoio, atenção e carinho.

À esta universidade pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação científica e crescimento pessoal. O meu muito obrigada.

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas”.

(Louis Pasteur)

ALMEIDA, Mayara de Alencar. **Produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa***. 2018. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O baixo número de processos industriais para obtenção de ramnolipídeos, em consequência dos altos custos de produção, tem incentivado, cada vez mais, o desenvolvimento de novos processos de produção. Dentre as diversas estratégias aplicadas tem-se os cultivos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma plataforma de produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando diferentes suportes sólidos. Definido o modelo, este foi comparado com cultivo submerso clássico quanto a cinética de produção do biossurfactante e análise de expressão gênica de *rhlA* por ensaio de atividade de β – galactosidase. Os resultados revelaram que a estratégia de fermentação submersa estática de leito raso em Erlenmeyer de fundo abaulado mostrou-se como o modelo ideal para produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, superando a fermentação submersa clássica em 1,35 vezes em 9 dias de cultivo. Os resultados da análise do perfil de expressão de *rhlA*, por sua vez, revelaram que esta plataforma de produção tem a capacidade de aumentar significativamente a expressão do gene *rhlA* e consequentemente a produção de ramnolipídeos. Os resultados obtidos com o presente trabalho sugerem que, a produção de ramnolipídeos por biofilme, é uma tecnologia fermentativa com grande potencial para viabilizar a produção biotecnológica de surfactantes.

Palavras-Chave: Ramnolipídeos. Biofilme. B – galactosidase. *Pseudomonas aeruginosa*.

ALMEIDA, Mayara de Alencar. **Rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm**. 2018. 126 pp. Dissertation (Master's on Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The low number of industrial production of rhamnolipids, as consequence of the high production costs, has encouraged the development of feasible production processes. Among of several strategies applied to this aim are the biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. Consequently, the present work aimed to establish a rhamnolipids production platform by biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*, using different solid supports. The chosen model was compared to classical submerged cultivation through the kinetics of biosurfactant production and the analysis of *rhIA* gene expression by β - galactosidase activity assay. The results suggest that the strategy of shallow-bed static-submerged fermentation in convex-bottom Erlenmeyer flasks was the best model for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, surpassing the rhamnolipid yield reached in classical submerged fermentation by 1,35 fold in 9 days of cultivation. The results of *rhIA* expression profile, revealed that this production platform has the ability to significantly increase rhamnolipids production through *rhIA* gene expression. The results of the present work suggest that this fermentative technology, biofilm production of rhamnolipids, presents a great potential to make feasible the biotechnological production of surfactants.

Key-words: Rhamnolipids. Biofilm. β – galactosidase. *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo esquemático da estrutura e mecanismo de atuação dos surfactantes.....	23
Figura 2 - Estruturas químicas das moléculas de mono e di-ramnolipídeos	29
Figura 3 - Biossíntese dos ramnolipídeos	41
Figura 4 - Operon rhlA-rhlB: (A) Esquema do operon rhlA-rhlB; (B) Região promotora putativa σ_{54} do operon rhlA-rhlB	42
Figura 5 - Operon PA1131-rhlC.....	43
Figura 6 - Estrutura das moléculas de acil-homoserinolactonas: (A) n-(3-oxododecanoil)-HSL e (B) n-butiril-HSL. (C) estrutura molecular da quinolona (2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona).....	45
Figura 7 - Quorum-sensing de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
Figura 8 - Modelo esquemático da regulação das regiões promotoras do gene rhlR.....	49
Figura 9 - Modelo esquemático da regulação do sistema AQ.....	51
Figura 10 - Ciclo de vida da bactéria: da fase unicelular (planctônica) à fase multicelular (biofilme).....	52
Figura 11 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa	57
Figura 12 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa com presença de suporte sólido inerte.....	58
Figura 13 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes	60
Figura 14 - (A) Minirreatores de ágar; (B) Erlenmeyer contendo os minirreatores de ágar; (C) Cultivo com minirreatores de ágar.....	61
Figura 15 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática de leite raso	62
Figura 16 - Placas de cultivo celular.....	63

Figura 17 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática em placas de cultivo celular	65
Figura 18 - Cultivo por fermentação submersa estática de leite raso com membrana de ágar	66
Figura 19 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática de leite raso com membrana de ágar.....	67
Figura 20 - (A)Erlenmeyer de fundo reto e (B) Erlenmeyer de fundo abaulado	68
Figura 21 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática de leite raso em erlenmeyers de diferentes formatos	68
Figura 22 - Desenho ilustrativo da clonagem da região promotora do gene <i>rhIA</i> no plasmídeo parental pSW205.....	70
Figura 23 - Fluxograma das estratégias fermentativas avaliadas para a produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Figura 24 - Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa com Presença de Suporte Sólido Inerte	78
Figura 25 - Microscopia de Varredura em cultivos Submersos com Presença de diferentes Suportes Sólidos Inertes	80
Figura 26 - Avaliação do efeito da agitação/aeração na produção de ramnolipídeos em cultivo submerso na presença de gaze.....	81
Figura 27 - Produção de ramnolipídeos obtida por fermentação submersa, fermentação semissólida estática em minirreatores de cubos de ágar e fermentação semissólida estática, em minirreatores de cubos de ágar submersos	84
Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura do cultivo FSS-MRA	85
Figura 29 - Fermentações semissólidas estáticas em minirreatores de cubos de ágar. Avaliação da composição dos reatores	86
Figura 30 - Fermentações semissólidas estáticas em minirreatores de cubos de ágar. Avaliação da adição de agentes indutores da	

	produção de ramnolipídeos, torta de milho (TM) e óleo de soja (OS).....	87
Figura 31	- Produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa de Leite Raso com e sem agitação do cultivo	90
Figura 32	- Produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática em Placas de Cultivo Celular.....	92
Figura 33	- Produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa de Leite Raso com membrana de ágar	94
Figura 34	- Avaliação da influência do formato do frasco sobre a produção de ramnolipídeos.....	95
Figura 35	- Avaliação do efeito do volume de água adicionado durante o cultivo na produção de ramnolipídeos.....	98
Figura 36	- Cinética de produção de ramnolipídeos por cultivo submerso (FSb) e cultivo submerso estático de leite raso em erlenmeyer de fundo abaulado (FSbE)	99
Figura 37	- Análise de expressão gênica em cultivos submersos e cultivos submersos estáticos de leite raso em erlenmeyer de fundo abaulado por ensaio de atividade de β – galactosidase.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais tipos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores	25
Tabela 2 - Microrganismos relatados como produtores de ramnolipídeos	33
Tabela 3 - Meio Luria-Bertani (LB) (pH 7)	55
Tabela 4 - Meio de sais (CAMILIOS-NETO, 2010).....	56
Tabela 5 - Volumes dos cultivos, por poços, realizados em placa de cultivo celular.....	64
Tabela 6 - Plasmídeos.....	70
Tabela 7 - Produção de ramnolipídeos obtidas por diferentes estratégias fermentativas avaliadas neste trabalho	126

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivo Específico	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Surfactantes	22
3.2	Biossurfactantes	23
3.3	Ramnolipídeos	26
3.3.1	Estrutura	28
3.3.2	Propriedades	30
3.3.3	Aplicações	31
3.3.4	Microrganismos produtores	33
3.3.5	Produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
3.3.6	Biossíntese de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3.4	<i>Quorum-Sensing</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
3.5	Produção de Ramnolipídeos, Formação de Biofilme e Circuito de <i>Quorum-Sensing</i>	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	Microrganismo	55
4.2	Meios de Preservação	55
4.3	Preparo do Pré-Inóculo	55
4.4	Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa	56
4.5	Definição de Modelo para Avaliação da Produção de Ramnolipídeos por Biofilme de <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	57
4.5.1	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa com presença de suporte sólido inerte	57
4.5.2	Produção de ramnolipídeos por fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes	59

4.5.2.1	Cultivos de fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes	59
4.5.2.2	Montagem dos minirreatores de ágar	60
4.5.3	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática de leito raso	61
4.5.4	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática em placas de cultivo celular	63
4.5.5	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática de leito raso com membrana de ágar	65
4.5.6	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática de leito raso em erlenmeyer de diferentes formatos	67
4.5.7	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática de leito raso em erlenmeyer de fundo abaulado	69
4.6	Análise de Expressão Gênica em Cultivos Submersos e Cultivos Submersos Estáticos de Leito Raso em Erlenmeyer de Fundo Abulado	69
4.6.1	Avaliação dos perfis de transcrição por fusão transcricional: montagem das fusões transcricionais e ensaio de atividade de β – galactosidase	69
4.6.1.1	Plasmídeos	70
4.6.1.2	Estoque	70
4.6.1.3	Manipulação de dna	71
4.6.1.3.1	Extração de dna plasmidial	71
4.6.1.3.2	Eletroforese em gel de agarose	71
4.6.1.4	Transformação bacteriana por choque térmico	71
4.6.1.4.1	Célula competente	71
4.6.1.4.2	Transformação por choque térmico	72
4.6.1.5	Ensaio de atividade de β -galactosidase	72
4.7	Métodos Analíticos	73
4.7.1	Determinação do crescimento bacteriano	73
4.7.2	Caracterização do biofilme	73
4.7.3	Quantificação dos ramnolipídeos	74
4.7.3.1	Extração dos ramnolipídeoS	74
4.7.3.2	Dosagem de ramnose pelo método do fenol-sulfúrico	74

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	Definição de Modelo para Avaliação da Produção de Ramnolipídeos por Biofilme de <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	75
5.1.1	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa com presença de suporte sólido inerte	77
5.1.1.1	Efeito da presença de um suporte sólido inerte na produção de ramnolipídeos	77
5.1.1.2	Efeito da agitação e aeração do meio sobre a produção de ramnolipídeos em cultivo submerso na presença de gaze	80
5.1.2	Produção de ramnolipídeos por fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes	82
5.1.2.1	Avaliação da presença de um suporte sólido e do volume do meio de cultivo, que recobre o suporte sólido, sobre a produção de ramnolipídeos	83
5.1.2.2	Avaliação da composição dos minirreatores de cubos de ágar sobre a produção de ramnolipídeos	85
5.1.2.3	Avaliação da capacidade de entrega controlada de nutriente	86
5.1.3	Fermentação submersa estática de leito raso	89
5.1.3.1	Avaliação da produção de ramnolipídeos por fermentação submersa de leito raso com e sem agitação do cultivo	89
5.1.4	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática em placas de cultivo celular	91
5.1.5	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática de leito raso com membrana de ágar	93
5.1.6	Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática de leito raso em frascos erlenmeyer de diferentes formatos	94
5.1.6.1	Avaliação da influência do formato do frasco sobre a produção de ramnolipídeos	94
5.1.6.2	Efeito do volume de água adicionado durante o cultivo na produção de ramnolipídeos	97
5.2	Cinética de Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa e Submersa Estática de Leito Raso em Erlenmeyer de Fundo Abaulado	98

5.3	Análise de Expressão Gênica em Cultivos Submersos e Cultivos Submersos Estáticos de Leito Raso em Erlenmeyer de Fundo Abaulado por Ensaio de Atividade de B – Galactosidase	100
6	CONCLUSÃO	103
6.1	Definição de Modelo para Avaliação da Produção de Ramnolipídeos por Biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
6.2	Análise de Expressão Gênica em Cultivos Submersos e Cultivos Submersos Estáticos de Leito Raso em Erlenmeyer de Fundo Abaulado por Ensaio de Atividade de B – Galactosidase	104
7	EXPERIMENTOS FUTUROS	105
	REFERENCIAS	106
	ANEXOS	125

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas capazes de reduzir a tensão superficial das interfaces óleo/água ou ar/água (LOVAGLIO *et al.*, 2015). Devido aos efeitos ambientais tóxicos dos surfactantes de origem química, há um crescente interesse pela substituição destes por congêneres de origem biológica (CAMILIOS-NETO, *et al.*, 2011; RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são uma das mais importantes classes de surfactantes microbianos. Estes compostos apresentam diversas aplicações em uma ampla gama de segmentos industriais e biotecnológicos, com destaque para processos envolvendo biorremediação (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011, HORI *et al.*, 2011; RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

Ramnolipídeos são glicolipídeos que podem ser produzidos em altas concentrações e com excelentes propriedades tensoativas (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2004) a partir de fontes de baixo custo, tais como carboidratos, óleos vegetais, óleos residuais, hidrocarbonetos, e efluentes de indústrias de alimentos e resíduos agroindustriais (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RIKALOVIĆ *et al.*, 2012).

Apesar das inúmeras aplicações e vantagens da utilização dos ramnolipídeos, a produção destes compostos em uma escala industrial/comercializável ainda é limitada devido ao alto custo de produção (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2015). Deste modo, tem-se buscado, cada vez mais, o desenvolvimento de processos que reduzam esses custos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; MANEERAT, 2005; RIKALOVIĆ *et al.*, 2012). Dentre as diversas estratégias aplicadas para obtenção de processos viáveis de produção de biosurfactantes tem-se os cultivos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (WIGNESWARAN *et al.*, 2016), uma estratégia ainda muito pouco explorada. Esta estratégia tecnológica mostra-se como potencial viabilizadora da produção de ramnolipídeos pelo fato de evitar a formação de espuma durante o processo fermentativo, problema recorrente nos cultivos submersos, além de permitir o uso de subprodutos ou rejeitos agroindustriais de baixíssimo custo como suporte sólido para o desenvolvimento do biofilme.

As razões fisiológicas e moleculares que justificam a utilização desta plataforma para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*

baseiam-se nas seguintes colocações: (1) a produção de ramnolipídeos por biofilme apresenta maiores taxas de produção comparada ao cultivo submerso clássico; (2) a produção de ramnolipídeos e o desenvolvimento de biofilme são regulados pelo *quorum-sensing*; e (3) o desenvolvimento de biofilmes maduros é dependente dos ramnolipídeos.

O *quorum-sensing* (QS) é o principal sistema de comunicação química bacteriana utilizado para controlar coletivamente o comportamento de grupo, por meio da percepção da densidade populacional. Neste sistema a bactéria produz, libera e detecta moléculas sinalizadoras difusíveis, que regulam a expressão de diversos genes (O'LOUGHLIN *et al.*, 2013). Estudos do transcriptoma de *Pseudomonas aeruginosa* mostraram que os genes envolvidos na síntese de ramnolipídeos estão entre as centenas de genes que são QS-regulados (HENTZER *et al.*, 2003; SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003).

O QS *Pseudomonas aeruginosa* é composto por dois tipos de moléculas sinalizadoras difusíveis, as N-acetil-homoserino lactonas (acil-HSLs) e uma quinolona (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona) (PQS), que coordenam o comportamento de grupo (DIGGLE *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2011). Estas moléculas ligam-se aos relativos fatores de transcrição (LasR, RhIR e MvfR), ativando a expressão dos genes alvos (OCHSNER & REISER, 1995; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013). Os circuitos *rhl*, *las* e *pqs* são arranjados hierarquicamente, de modo que exercem influência na regulação de um sobre o outro.

Uma vez que, altas taxas de produção de ramnolipídeos podem ser obtidas por biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, e que existe uma aparente relação direta entre formação de biofilme, ativação do QS e produção de ramnolipídeos o presente trabalho tem como objetivo estabelecer uma plataforma de produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver processos de produção e extração de ramnolipídeos obtidos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 Objetivo Específico

- Avaliar o efeito da presença de diferentes suportes sólidos inertes na produção de ramnolipídeos;
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura a adesão e a provável formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* crescendo em cultivos com suporte sólido;
- Avaliar o efeito da agitação/aeração do sistema sobre a produção de ramnolipídeos em cultivos submersos na presença de suporte sólido;
- Desenvolver processo de produção de ramnolipídeos com sistema de difusão controlada de nutrientes;
- Avaliar a produção de ramnolipídeos por fermentação submersa de leito raso com e sem agitação/aeração do sistema;
- Avaliar a produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática em placas de cultivo celular;
- Comparar as cinéticas de produção de ramnolipídeos por fermentação submersa clássica e fermentação submersa estática de leito raso;
- Comparar as cinéticas de expressão da fusão *rhIA-lacZ* (ensaio de atividade de β – galactosidase) de fermentações submersas clássicas e fermentações submersas estáticas de leito raso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

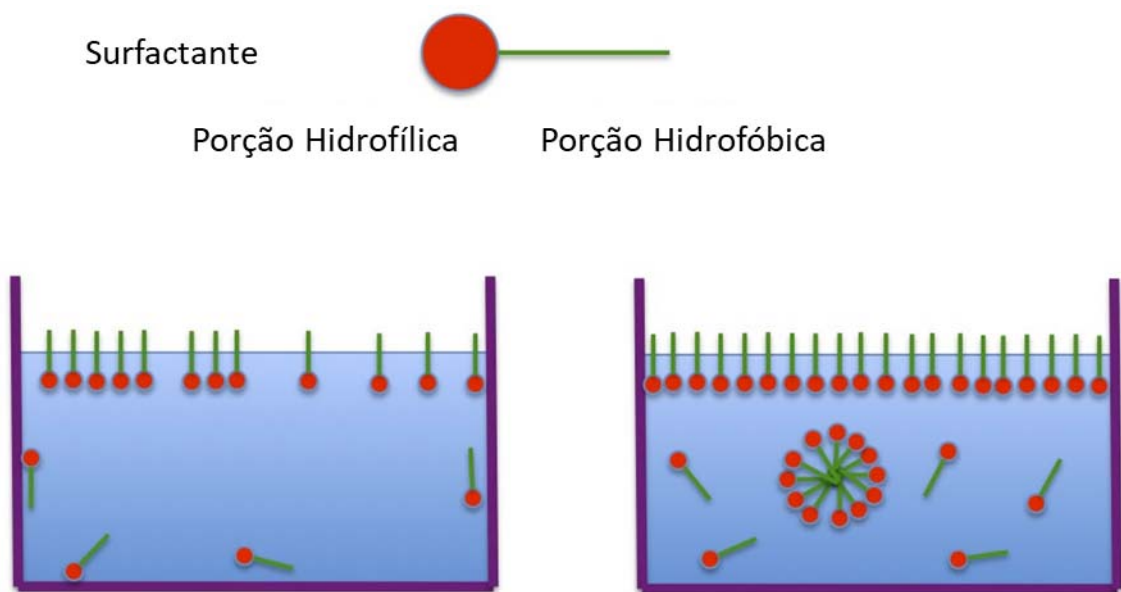
3.1 SURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfipáticas capazes de reduzir as tensões superficiais e interfaciais entre fluidos imiscíveis ou um fluido e um sólido, quando em baixa concentração em um sistema, devido a tendência das ligações hidrofílicas e hidrofóbicas da molécula em adsorver sobre interfaces com diferentes graus de polaridade, como óleo / água e ar / água (Figura 1) (GODDARD, 1989; KRONEMBERGER, 2007; LOVAGLIO *et al.*, 2015; RIKALOVIC *et al.*, 2012).

Os surfactantes estão entre os produtos mais versáteis da indústria química e representam um mercado mundial equivalente a bilhões de dólares por ano (GALGANO, 2012; TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010). Estes tensoativos são amplamente utilizados em produtos diversos tais como produtos farmacêuticos, detergentes, como agentes emulsionantes nas indústrias de cosméticos e alimentos, na recuperação de óleo de reservatórios, e aditivos na indústria de construção e petróleo (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; GODDARD, 1989; ZHU *et al.*, 2012).

Devido aos efeitos ambientais tóxicos e baixa biodegradabilidade dos surfactantes de origem química, combinado com os potenciais efeitos nocivos ao meio-ambiente dos subprodutos gerados em sua síntese, o uso de surfactantes de origem biológica vem recebendo destaque na busca pela substituição de compostos quimicamente sintetizados por uma tecnologia baseada em "bio" e "soluções verdes" (BAFGHI; FAZAELIPOOR, 2012; HE *et al.*, 2017; LAMARCHE; DÉZIEL, 2011; MOUSSA; MOHAMED; SAMAK, 2014; RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

Figura 1 – Modelo esquemático da estrutura e mecanismo de atuação dos surfactantes.



Fonte: Adaptado de PIRIKA - JAVA, HTML5 & CHEMISTRY SITE.

3.2. BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são biomoléculas com atividade de surfactante, produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Tabela 1) (DELEU & PAQUOT, 2004; LOVAGLIO *et al.*, 2015). Estes metabólitos secundários podem ser encontrados tanto na superfície celular quando em secreções extracelulares (JOY *et al.*, 2017).

Tais metabólitos são compostos por um porção hidrofílica constituída de aminoácidos, peptídeos, proteínas, mono, di ou polissacarídeos; ligada a uma

porção hidrofóbica formada por uma cadeia hidrocarbonada de ácidos graxos ou álcoois graxos, do tipo saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados (BAFGHI; FAZAEIPOOR, 2012; JOY *et al.*, 2017; LOVAGLIO *et al.*, 2015; RIKALOVIC *et al.*, 2012).

Os biossurfactantes microbianos desempenham papel fundamental na motilidade celular, interações célula-célula (formação de biofilme, *quorum-sensing* e patogenicidade), modificação de membrana (aumento de hidrofobicidade), dentre outros (JOY *et al.*, 2017; RIKALOVIC *et al.*, 2012). Além disso, podem comportar-se como moléculas de armazenamento de carbono e energia, como indutores do aumento de solubilidade de moléculas hidrofóbicas sorvidas em superfícies, ou ainda podem ser subprodutos secretados em resposta a alterações do meio (JOY *et al.*, 2017; RIKALOVIC *et al.*, 2012; VAN HAMME *et al.*, 2006).

Estas biomoléculas por possuírem baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, maior compatibilidade ambiental, e alta seletividade e atividade específica a temperaturas e pH extremos, apresentam diversas vantagens sobre seus congêneres de origem química (RIKALOVIC *et al.*, 2012; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2012). Adicionalmente, apresentam maior potencial de mercado em aplicações nas quais se faz necessário dispersar agentes tensoativos no ambiente, como na limpeza de derrames de óleos e outros compostos hidrofóbicos e na recuperação de petróleo dos reservatórios (RIKALOVIC *et al.*, 2012; LOVAGLIO *et al.*, 2015); podendo também potencializar processo de biorremediação (BAPTISTA, 2007; CALVO *et al.*, 2009).

Biorremediação pode ser definido como um processo de utilização de organismos vivos, como bactérias, fungos e plantas, na recuperação e/ou remoção de contaminantes ambientais (solo, sedimentos, água, ar) (PIRES *et al.*, 2003; PHILLIPS, 2017). No caso de processos de biorremediação utilizando microrganismos, estes apresentam a capacidade de degradar contaminantes orgânicos, extraindo nutrientes importantes para o seu crescimento e reprodução (NATIONAL RESEARCH COUNCIL *et al.*, 1993). Os biossurfactantes possuem um alto potencial de aplicação em processos de biorremediação envolvendo derramamento e recuperação de compostos hidrofóbicos, uma vez que podem aumentar a disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos (BAPTISTA, 2007).

Segundo o relatório de pesquisa da Global Market Insights, estima-se que o mercado de biossurfactantes deva gerar até 2024 valores superiores a US \$ 2,7 bilhões; sendo USD 600 milhões nos EUA e USD 210 milhões no Reino Unido. Dentre os diferentes tipos de biossurfactantes comercializados, o mercado de ramnolipídeos pode apresentar um crescimento de mais de 8% até 2024; enquanto que os de soforolipídeos e metil éster sulfonado devam gerar valores superiores a USD 3.3 milhões e USD 900 milhões, respectivamente, até o final do mesmo período (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2018).

Os biossurfactantes podem ser classificados em dois grupos: moléculas de baixa massa molecular e de alta massa molecular. Biossurfactantes de baixa massa molecular são biomoléculas com alta capacidade de redução de tensão superficial e interfacial; enquanto biossurfactantes de alta massa molecular destacam-se por apresentarem melhores propriedades emulsificantes, sendo deste modo denominados bioemulsificantes (JOY *et al.*, 2017; RIKALOVIC *et al.*, 2012).

Diferentemente dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são usualmente classificados quanto a sua natureza bioquímica (estrutura química e sua origem microbiana). As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, ácidos graxos e fosfolipídeos e biossurfactantes poliméricos; sendo a primeira (glicolipídeos) a classe de surfactantes microbiológicos mais estudada, com destaque para os ramnolipídeos, trealopídeos, soforolipídeos e lipídeos de manosileritritol (JOY *et al.*, 2017; KRONEMBERGER, 2007; LOVAGLIO *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Principais tipos de biossurfactantes e seus microrganismo produtores.

Biossurfactante	Microrganismo Produtor
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>T. apícola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

Lipopeptídeos e lipoproteínas

Peptídio-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>

Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídeos

Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>

Surfactantes poliméricos

Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: CAMILIOS-NETO, 2010.

3.3 RAMNOLIPÍDEOS

Os ramnolipídeos (RL) são biossurfactantes do tipo glicolipídeos, produzidos principalmente pelo microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; WITTEGENS *et al.*, 2017).

Estas biomoléculas apresentam funções fisiológicas associadas a motilidade bacteriana (do inglês *swarming*), desenvolvimento de biofilme, e absorção e biodegradação de compostos com baixa solubilidade por meio de dissolução e

emulsificação destes (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2017; RIKALOVIC *et al.*, 2012, 2013; VATSA *et al.*, 2010). Apresentam ainda efeito direto na estrutura e morfologia da superfície da célula bacteriana, sem provocar alterações no crescimento e viabilidade do microrganismo. Quando presente em concentração abaixo da sua concentração micelar crítica (CMC) os ramnolipídeos são capazes de reduzir a quantidade de proteínas na membrana externa do microrganismo. Em concentrações acima da CMC levam a um aumento da hidrofobicidade da superfície celular pela perda de lipopolissacarídeos (SOTIROVA *et al.*, 2009).

Além disso, são capazes de proteger a célula microbiana do sistema de defesa do hospedeiro (inibir a fagocitose por macrófagos), e podem ainda atuar como hemolisinas, o que caracteriza os ramnolipídeos como um importante fator de virulência do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* (WITTGENS *et al.*, 2017)

O primeiro relato referente aos RL deu-se por Bergström *et al.* (1946), que observaram a produção de um glicolípido oleoso por *Pseudomonas pyocyanea* (mais tarde classificada como *Pseudomonas aeruginosa*) quando cultivada em meio contendo glicose. Subsequentemente, no ano de 1949, Jarvis e Johnson descreveram uma substância produzida por estirpes *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente quando cultivados em fontes de carbono não miscíveis em água, que era excretada para o espaço extracelular (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; JARVIS & JOHNSON, 1949; MÜLLER *et al.*, 2012). Esta substância foi denominada ácido piolípico e as suas unidades estruturais foram identificadas como L-ramnose e ácido β -hidroxidecanóico (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; BERGSTRÖM *et al.*, 1946; EDWARDS & HAYASHI, 1965; HAUSER & KARNOVSKY, 1954; JARVIS & JOHNSON, 1949).

A partir de então diversos estudos vêm sendo realizados englobando aspectos da produção de RL; incluindo investigação dos genes responsáveis pela produção e regulação, além da compreensão do papel dessas biomoléculas para os microrganismos produtores, bem como suas interações com outros sistemas biológicos, tais como plantas e animais (ABDEL-MAWGOUD; LEPINE; DÉZIEL, 2010; ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; PILJAC, 2012; VATSA *et al.*, 2010).

3.3.1 Estrutura

Os RL são glicosídeos microbianos aniônicos formados por uma região glicona e uma região aglicona ligadas entre si por meio de uma ligação glicosídica (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; EDWARDS & HAYASHI, 1965; MÜLLER *et al.*, 2012; WITTGENS *et al.*, 2017).

A região glicona é composta por um (mono-RL) ou dois açúcares ramnose (di-RL) (EDWARDS & HAYASHI, 1965; JARVIS & JOHNSON, 1949; LOVAGLIO *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2017) unidos por uma ligação α -1,2-glicosídica (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; EDWARDS & HAYASHI, 1965).

A região aglicona, por sua vez, é composta geralmente por um ou dois ácidos graxos β -hidroxilados (JARVIS & JOHNSON, 1949; ITOH *et al.*, 1971; LOVAGLIO *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2017), ligados entre si através de uma ligação éster formada entre o grupo β -hidroxilado da cadeia distal (em relação ao açúcar) e o grupo carboxílico da cadeia proximal (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; HIRAYAMA & KATO, 1982; WITTGENS *et al.*, 2017). Estas cadeias de ácidos graxos são geralmente saturadas, porém cadeias mono- ou poli-insaturadas podem ser encontradas, menos comumente (ABALOS *et al.*, 2001; ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2016). As cadeias podem, ainda, variar em comprimento entre C8 e C14 (WITTGENS *et al.*, 2017), sendo o ácido hidroxidecanóico (C10) o ácido graxo mais comumente encontrado na fração lipídica da molécula de ramnolípido. Dentre os possíveis substituintes do ácido hidroxidecanóico destacam-se os ácidos hidroxiocetanóico (C8), hidroxidodecanóico (C12) e hidroxidecanóico (C12: 1) (BENINCASA *et al.*, 2004; WADEKAR *et al.*, 2012).

Deste modo, os congêneres de ramnolípídeos mais frequentemente produzidos são L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha-C10-C10) e L-ramnosil-L-rhamnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha2-C10-C10) (Figura 2) (BENINCASA *et al.*, 2004; LOVAGLIO *et al.*, 2015; WADEKAR *et al.*, 2012).

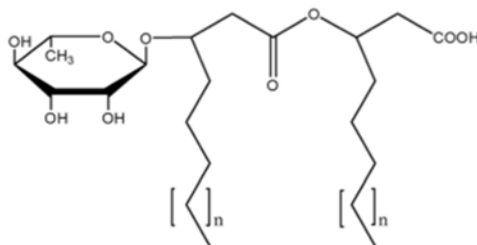
Devido à variedade de congêneres possíveis de ramnolípídeos (cerca de 60 descritos atualmente), os quais são produzidos por cepas e condições de cultivos específicas, estes biossurfactantes podem ser divididos em quatro grandes grupos de homólogos: RL1 (mono-ramno-di-lipídico), RL2 (mono-ramno-monolipídico), RL3

(di-ramno-di-lipídico) e RL4 (di-ramno-mono-lipídico), sendo os homólogos RL1 e RL3 os mais comumente produzidos, enquanto RL2 e RL4 são sintetizados em certas condições de cultivo (RIKALOVIC *et al.*, 2013).

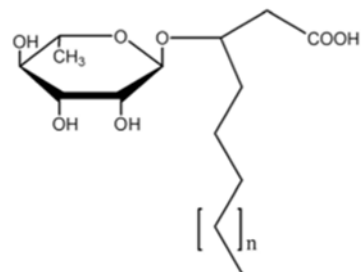
Figura 2 – Estruturas químicas das moléculas de mono e di-ramnolipídeos.

Mono-ramnolipídeos

Mono-ramno-di-lipídeo

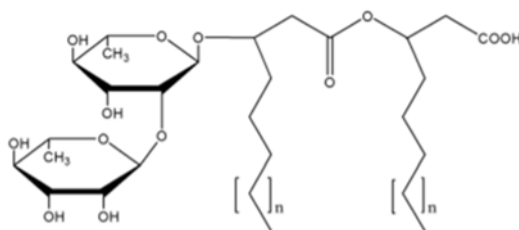


Mono-ramno-mono-lipídeo

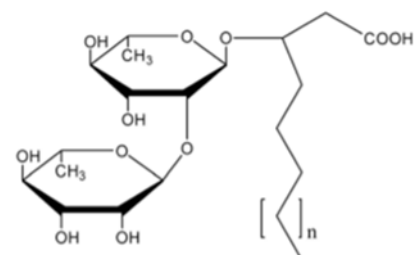


Di-ramnolipídeos

Di-ramno-di-lipídeo



Di-ramno-mono-lipídeo



Fonte: Adaptado de WITTEGENS *et al.*, 2017.

3.3.2 Propriedades

As propriedades e atividades biológicas inerentes aos biossurfactantes associadas as demais características intrínsecas dos ramnolipídeos, conferem a esta biomolécula um grande potencial industrial, fazendo destes glicolipídeos a classe de surfactantes mais estudada (DAS; YANG; MA, 2014; LOVAGLIO *et al.*, 2015).

Os ramnolipídeos exibem alta atividade emulsificante uma vez que apresentam valores de equilíbrio hidrófilo-lipofílico (EHL) segundo Griffin (1954) entre 4 e 6, formando assim emulsões altamente estáveis de compostos hidrofóbicos em soluções aquosas (MÜLLER *et al.*, 2012; PATEL & DESAI, 1997a, b). O equilíbrio hidrófilo-lipofílico é um balanço numérico entre o tamanho e a força hidrófilica-lipofílica de um surfactante. O EHL de Griffin varia em uma escala de 0 a 20, de modo que surfactantes com EHL = 1 apresentam alta solubilidade em óleo, e surfactantes com EHL = 15 apresentam solubilidade em água (WILLIAMS, 2007; ZHENG *et al.*, 2015).

Além disso apresentam alto poder tensoativo, sendo capazes de reduzir a tensão superficial (TS) da água de 72 mN/m para valores entre 25-30 mN/m (ABALOS *et al.*, 2001; DAS; YANG; MA, 2014) apresentando concentrações micelares críticas (CMC) situadas entre 5 e 200 mg/L (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Alguns estudos vêm mostrando uma correlação entre os valores de CMC e a razão de mono e di-ramnolipídeos. Reduções nos valores de CMC podem ser observados com o aumento da proporção da relação mono / di-ramnolipídeos, demonstrando que os mono-ramnolipídeos são capazes de formar micelas em menor concentração que os di-ramnolipídeos (CAMILIOS-NETO, 2010; REDDY *et al.*, 2016; RIKALOVIC *et al.*, 2013).

Essa relação por sua vez não pode ser claramente observada quanto a atividade emulsificante dessa molécula, uma vez que esta pode variar dependendo do hidrocarboneto avaliado e da cepa produtora. Em estudo realizado por Das, Yand e Ma (2014), utilizando soluções de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* IMP67, observou-se uma diminuição dos valores de índice de emulsificação (EI), contra petróleo e diesel, quando a proporção de di-ramnolipídeos aumentava em relação aos mono-ramnolipídeos. Já em estudo realizado por Camilios-Neto, *et al* (2009), utilizando

soluções de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, pode-se constatar um maior EI contra gasolina para solução contendo apenas di-ramnolipídeos, e um maior EI contra diesel, querosene e tolueno para solução contendo mistura de mono e di-ramnolipídeos.

Adicionalmente, já foram descritas propriedades antibacterianas destes compostos (DAS; YANG; MA, 2014), assim como antifúngicas (DEEPIKA; SRIDHAR; BRAMHACHARI, 2015; REDDY *et al.*, 2016), antivirais e micoplasmacidal (ITOH *et al.*, 1971) contra diversos microrganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora nicotianae*, *Botrytis sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum sp.*, *Pythium sp.*, *Plasmopara sp.*, *Vaccinia virus* e *Mycoplasma laidlawii*. Atividades anti-adesiva e disruptora de biofilme contra microrganismos patogênicos também já foram descritas (DAS; YANG; MA, 2014).

As dadas propriedades os tornam adequados para utilização em diversas aplicações industriais envolvendo detergentes, lubrificação por emulsificação, capacidade de formação de espuma, molhagem, solubilização e dispersão de fase, biorremediação de poluentes (BANAT *et al.*, 2000; LOVAGLIO *et al.*, 2015; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016), assim como na indústria de cosméticos, alimentos e farmacêutica (EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016; WITTGENS *et al.*, 2017).

3.3.3 Aplicações

Devido às suas excelentes atividades surfactantes, e propriedades físico-químicas, os RL destacam-se por suas aplicações em diversos segmentos industriais e biotecnológicos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011, HORI *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2007) a seguir descritas:

(1) Biorremediação e aumento da recuperação de óleo: Devido as suas excelentes propriedades emulsificantes (RANDHAWA & RAHMAN, 2014) os ramnolipídeos podem ser aplicados na síntese e estabilização de nanopartículas, na biorremediação de ambientes poluídos por petróleo e derivados (ADBEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2015; PALANISAMY; RAICHUR, 2009; WU *et al.*, 2017; XIE *et al.*, 2006), na recuperação terciária de óleos (ADBEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; DAS; YANG; MA, 2014; HORI *et al.*, 2011), na

descontaminação de áreas contaminadas com óleo (SPONZA & GOK, 2010; WU *et al.*, 2017), e na remoção de metais pesados de solos (WU *et al.*, 2017).

(2) Fármacos e terapêuticos: Perante sua baixa toxicidade, propriedades surfactantes (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013) e atividades antibiótica, antibacteriana, antifúngica e antiviral (DAS; YANG; MA, 2014; ITOH *et al.*, 1971; RANDHAWA; RAHMAN, 2014; REDDY *et al.*, 2016) contra diversos microrganismos, os ramnolipídeos apresentam aplicações promissoras no desenvolvimento de fármacos e terapêuticos (HORI *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2015; MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013; RANDHAWA & RAHMAN, 2014). Podem atuar também de forma sinérgica com alguns antibióticos (ampicilina, tetraciclina, canamicina), auxiliando na penetração dos mesmos na célula (DAS; YANG; MA, 2014).

(3) Cosméticos: RL já foram descritos por apresentarem aplicações em diversos tratamentos de pele, tais como no tratamento de feridas com fibrose reduzida, cicatrização de queimadura, tratamento de rugas (HORI *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2015; PILJAC & PILJAC, 2007; RANDHAWA & RAHMAN, 2014).

(4) Detergentes e produtos de limpeza: Os ramnolipídeos são emulsificantes naturais e agentes tensoativos de modo que podem ser amplamente utilizados na composição de detergentes, produtos de lavagem, xampus e sabões (PARRY *et al.*, 2013; RANDHAWA; RAHMAN, 2014; WU *et al.*, 2017). Além disso, podem ser utilizados no preparo de microemulsões (ADBEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; NGUYEN; SABATINI, 2009; XIE *et al.*, 2007), como agente antiaglomeração (ADBEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; YORK; FIROOZABADI, 2008) e agente dispersante (ADBEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; RAICHUR, 2007; TRIPATHY & RAICHUR, 2008).

(5) Agricultura: Devido às propriedades tensoativas e menor retenção no solo dos RL comparados aos surfactantes de origem química (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011), os ramnolipídeos possuem aplicações na remediação do solo visando à melhora na qualidade do mesmo (RANDHAWA & RAHMAN, 2014; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). A potencial capacidade de eliminação de patógenos destas biomoléculas também vem sendo estudada, além de aplicações no auxílio da absorção de compostos como fertilizantes e nutrientes por plantas e assim como biopesticidas (RANDHAWA; RAHMAN, 2014; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013; WU *et al.*, 2017).

(6) Como fonte de ramnose (ADBEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; LINHARDT *et al.*, 1989).

3.3.4 Microrganismos Produtores

Os ramnolipídeos são glicolipídeos produzidos por uma série de microrganismos (Tabela 2) (ANDRÄ *et al.*, 2006; DUBEAU *et al.*, 2009; HAÜSSLER *et al.*, 1998; HAÜSSLER *et al.*, 2003; NAYAK *et al.*, 2009; RANDHAWA & RAHMAN, 2014; ROONEY *et al.*, 2009) tendo como seus principais produtores bactérias do gênero *Pseudomonas* (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2017; WITTGENS *et al.*, 2017); com destaque para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, que produz RL do tipo mono e di-ramnolipídeos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; RANDHAWA & RAHMAN, 2014; ZHU *et al.*, 2012).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa ubíqua encontrada em solos, pântanos e em habitats marinhos litorâneos, além de tecidos de planta e animais. (STOVER *et al.*, 2000; TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

Este microrganismo apresenta grande importância clínica devido ao fato de ser uma das três principais causas de infecções humanas oportunistas (STOVER *et al.*, 2000; TERZIYSKI *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2015), como as infecções ocorrentes em pacientes com fibrose cística, infecções em unidades de queimadura de hospitais e infecções causadas por meio de dispositivos médicos implantados, incluindo tubos de intubação e *stents* (O'LOUGHLIN *et al.*, 2013).

Além da importância clínica, *Pseudomonas aeruginosa* destaca-se também pela alta produção de ramnolipídeos por meio de vias metabólicas centrais, como as vias envolvendo síntese de ácidos graxos e de açúcares ativados com desoxitimidina difosfato (dTDP). Deste modo, este microrganismo vem sendo extensivamente utilizado como modelo para o estudo da síntese e regulação deste biossurfactante (TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

Tabela 2 – Microrganismos relatados como produtores de ramnolipídeos.

Microrganismo	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bergström <i>et al.</i> , 1946 Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> , 2011 Randhawa & Rahman, 2014
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Randhawa & Rahman, 2014

<i>Pseudomonas plantarii</i>	Randhawa & Rahman, 2014
<i>Pseudomonas putida</i>	Randhawa & Rahman, 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Randhawa & Rahman, 2014
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	Nayak <i>et al.</i> , 2009
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Rooney & Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Lovaglio <i>et al.</i> , 2015
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Rooney & Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Lovaglio <i>et al.</i> , 2015
<i>Enterobacter asburiae</i>	Rooney & Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Lovaglio <i>et al.</i> , 2015
<i>Pantoea stewartii</i>	Rooney & Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Lovaglio <i>et al.</i> , 2015
<i>Burkholderia thailandensis</i>	Haüssler <i>et al.</i> , 1998 Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Haüssler <i>et al.</i> , 2003 Andrä <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia plantarii</i>	Haüssler <i>et al.</i> , 1998 Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Haüssler <i>et al.</i> , 2003 Andrä <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Haüssler <i>et al.</i> , 1998 Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Haüssler <i>et al.</i> , 2003 Andrä <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia mallei</i>	Haüssler <i>et al.</i> , 1998 Dubeau <i>et al.</i> , 2009 Haüssler <i>et al.</i> , 2003 Andrä <i>et al.</i> , 2006

Fonte: O autor.

3.3.5 Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*

A produção de RL por *Pseudomonas aeruginosa* mostra-se vantajosa em relação à produção destes por demais microrganismos e em relação à produção de outros biossurfactantes, devido a dois fatores. Em primeiro lugar, estas biomoléculas apresentam elevadas atividades tensoativas e produção com alto rendimento após períodos de incubação relativamente curtos por um microrganismo bem conhecido e de fácil cultivo. Em segundo lugar, são um dos fatores de virulência que contribuem para a patogênese de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* e, conseqüentemente, muitos aspectos da biossíntese de RL têm sido investigados, em parte, para controlar sua produção e seus efeitos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011).

Apesar das inúmeras aplicações e vantagens da utilização dos RL e dos avanços nas adequações da tecnologia de laboratório para maior escala; a produção destes compostos em escala industrial/comercializável ainda é limitada devido ao seu alto custo (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2015; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017), conseqüente dos altos preços dos substratos utilizados, da concentrações limitadas de produto obtido pelos processos fermentativos, e devido ao alto custo dos processos de separação, isolamento e purificação dos ramnolipídeos (KASKATEPE; YILDIZ, 2016; SHAH *et al.*, 2016).

De modo a superar tais obstáculos e competir com tensoativos sintéticos, busca-se cada vez mais o desenvolvimento de processos que reduzam os custos de produção (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011; MANEERAT, 2005; RIKALOVIĆ *et al.*, 2012; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016), os quais envolvem a utilização de substratos baratos, microrganismos eficazes (MANEERAT, 2005; RIKALOVIĆ *et al.*, 2012) e estratégias fermentativas eficientes (HE *et al.*, 2017; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016).

A síntese de ramnolipídeos foi descrita numa variedade de estratégias as quais incluem cultivos em frascos do tipo Erlenmeyer (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2004; RIKALOVIC *et al.*, 2012), reator (CAMILIOS-NETO, 2010; KRONEMBERGER, 2007), batelada, batelada alimentada (TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003; ZHU *et al.*, 2012), contínua, e processos microbianos/enzimáticos integrados (MÜLLER *et al.*, 2012); sendo a batelada alimentada a tecnologia fermentativa mais empregada devido aos resultados satisfatórios obtidos por esta.

Quanto à composição do meio de cultivo, devido ao fato dos ramnolipídeos serem metabólitos secundários, sua produção ocorre em condições limitantes do crescimento; contudo estas condições limitantes excluem a limitação de fonte de carbono (MÜLLER *et al.*, 2012).

Diversas fontes de carbono já foram descritas na literatura para a produção de ramnolipídeos tais como alcanos, (ITOH *et al.*, 1971; MÜLLER *et al.*, 2012), glicose (WADEKAR *et al.*, 2010), glicerol, etanol e glicerolipídeos (MÜLLER *et al.*, 2012), além de fontes renováveis de baixo custo, incluindo substratos hidrofílicos (carboidratos) e hidrofóbicos (óleos vegetais, óleos residuais, óleos de fritura, hidrocarbonetos) (HOLMBERG, 2001; JI *et al.*, 2016; LOVAGLIO *et al.*, 2015; NITSCHKE *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2010) ou mesmo efluentes de indústrias de alimentos e resíduos agroindustriais (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; GEORGE & JAYACHANDRAN, 2008; GUDINÃ *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2009; NITSCHKE *et al.*, 2005; RIKALOVIĆ *et al.*, 2012; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016).

Maiores rendimentos de ramnolipídeos são obtidos com substratos insolúveis em água, especialmente óleos vegetais (WU *et al.*, 2017) como o azeite (JI *et al.*, 2016; ROBERT *et al.*, 1989) e óleo de canola (SIM *et al.*, 1997), quando comparados com substratos solúveis em água como glicose e glicerol. Tal rendimento pode ser justificado pela presença de ácido oleico e ácido linoleico em elevadas quantidades na composição destes óleos, os quais já foram descritos como capazes de estimular a produção deste surfactante (GUNSTONE, 1984). As razões biológicas envolvendo este aumento de produção, entretanto, ainda não são elucidadas. A presença de monoacilgliceróis ou diacilgliceróis, em contrapartida, podem culminar em alta taxa de emulsificação e retardar o processo de purificação do surfactante (WU *et al.*, 2017).

Concentrações de óleo vegetal entre 4-6 % são ditas como ótimas para a produção de ramnolipídeos (GUNSTONE, 1984). Deste modo a utilização de óleos vegetais para a produção de ramnolipídeos passou a ser recorrente (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2004; JI *et al.*, 2016; TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003; WU *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2012).

Quanto à fonte de nitrogênio, estudos vêm demonstrando que esta deve ser limitada para que se possam alcançar altas produções de ramnolipídeos (GUNSTONE, 1984), de modo que relações C / N elevadas são necessárias para a produção deste surfactante (CHAYABUTRA *et al.*, 2001; GUERRA-SANTOS *et al.*,

1984, 1986; RIKALLOVI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2017). Fontes de nitrogênio tais como nitrato, glutamato, aspartato, amoníaco, uréia, misturas complexas contendo aminoácidos já foram utilizados em cultivos com *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de ramnolipídeos (CHAYABUTRA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2011; MÜLLER *et al.*, 2012; RIKALLOVI *et al.*, 2012; SYLDATK & WAGNER, 1987; ZHANG & MILLER, 1992).

Diversos estudos demonstraram que fatores como temperatura, taxa de agitação e pH também influenciam na produção de ramnolipídeos. Estudos de otimização da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* evidenciaram que as condições ótimas de temperatura, agitação e pH para a produção deste metabólito são entre 28-37°C, 180-250 rpm, e 7 e 7,5, respectivamente (CAMILIOS-NETO, 2010; CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; JI *et al.*, 2016; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2012)

O emprego de técnicas de engenharia genética na produção de ramnolipídeos vem se tornando cada vez mais comum (GROSSO-BECERRA *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2017; TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010; ZHAO *et al.*, 2015). Dentre estes destacam-se estudos que buscam o aumento da produção deste biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*, por meio do aumento do número de cópias de genes relacionados a biossíntese de ramnolipídeos e por modificações nas regiões promotoras destes genes (GROSSO-BECERRA *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2015).

Além disso, vem-se desenvolvendo diversas pesquisas envolvendo a utilização de hospedeiros heterólogos, como *P. fluorescens*, *P. putida* e *E. coli* nos processos de produção de ramnolipídeos, visando a substituição da bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa* (HE *et al.*, 2017; TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010). Para isto, são inseridos, nestes microrganismos, plasmídeos contendo os genes necessários para a biossíntese destes compostos, como *rhIA*, *rhIB*, e *rhIC* (HE *et al.*, 2017; TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

Grande parte dos estudos envolvendo a produção de ramnolipídeos foi realizada com fermentação submersa, de modo que a quantidade de ramnolipídeos produzida por esta estratégia fermentativa varia conforme o tipo e a escala de

processo, o meio e as condições de cultivo utilizadas (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010).

Diferentes níveis de produção e produtividade de ramnolipídeos, obtidos por fermentação submersa, podem ser encontrados na literatura; produções variando de 7,54 g/L a 70,56 g/L e produtividades de 0,086 a 1 g/L/d, utilizando glicerol, óleo de canola, óleo de peixe ou óleo de soja como fonte de carbono (HE *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2004; TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003; ZHU *et al.*, 2012).

A fermentação submersa, por sua vez, enfrenta um problema severo quando utilizada para produzir tensoativos, devido a sua condução com aeração forçada e agitação, o que acarreta na formação de grande quantidade de espuma quando o biossurfactante começa a ser produzido (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010; WU *et al.*, 2017).

Esta formação de espuma culmina em diversos efeitos deletérios que acarretam em perda de rendimento e produtividade, além de gerar dificuldades operacionais (CAMILIOS-NETO, 2010; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010). Em primeiro lugar, há uma tendência de o microrganismo acumular-se na espuma, removendo assim as células do meio de cultura. Em segundo lugar, a presença da espuma reduz a eficiência da transferência de gás entre as fases de gás e líquido no biorreator, reduzindo as taxas de fornecimento de oxigênio ao líquido e remoção de dióxido de carbono a partir dele (KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010). Em terceiro lugar, há uma tendência da espuma sair do reator e conseqüentemente carregar nutrientes, produtos e biomassa (CAMILIOS-NETO, 2010). Assim, se faz necessário à utilização de métodos de contenção de formação de espuma (CAMILIOS-NETO, 2010; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010).

Basicamente, duas estratégias têm sido utilizadas para combater a formação de espuma em fermentação submersa: a estratégia “química”, a qual envolve a adição de agentes anti-espumantes no meio de cultivo; e a estratégia “mecânica”, que consiste na utilização de aparelhos projetados para quebrar a espuma (CAMILIOS-NETO, 2010). Entretanto, a utilização destas estratégias apresenta certas desvantagens. No caso na estratégia química esta pode gerar interferência na transferência de O₂ e CO₂ entre as fases líquida e gasosa, a geração de reações inibitórias e efeitos tóxicos ao microrganismo, e necessidade de métodos de separação do anti-espumante do produto final, encarecendo o processo (LEE; KIM,

2004; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010; YEH *et al.*, 2006). Em relação à estratégia mecânica, os “quebradores de espuma” instalados no eixo do agitador do reator apresentam capacidade limitada de contenção da espuma formada por biossurfactantes, necessitando assim, a instalação de um sistema de “quebradores externos com sistema coletor” objetivando a recuperação da espuma formada (contendo biomassa, nutrientes e o tensoativo), para que esta seja convertida em líquido e devolvida ao reator, o que encarece o processo (KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010).

Outra alternativa para se evitar a formação de espumas é a utilização de cultivos em estado sólido. Esta tecnologia fermentativa apresenta vantagens como utilizar substratos de baixo custo, e evitar o problema da formação de espuma que complica os processos de cultivo submerso para a produção de biossurfactantes (KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010; WU *et al.*, 2017). Estudos realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com mistura de 50:50 (m/m) de bagaço de cana de açúcar e torta de milho suplementado com solução contendo 6% (v/v) de glicerol e óleo de soja (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011), obtendo produção de 45 g/L de ramnolipídeos e produtividade 0.156 g/L/h, mostraram que produções de ramnolipídeos equivalentes à produção obtida por fermentação submersa podem ser alcançadas por esta estratégia fermentativa.

3.3.6 Biossíntese de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*

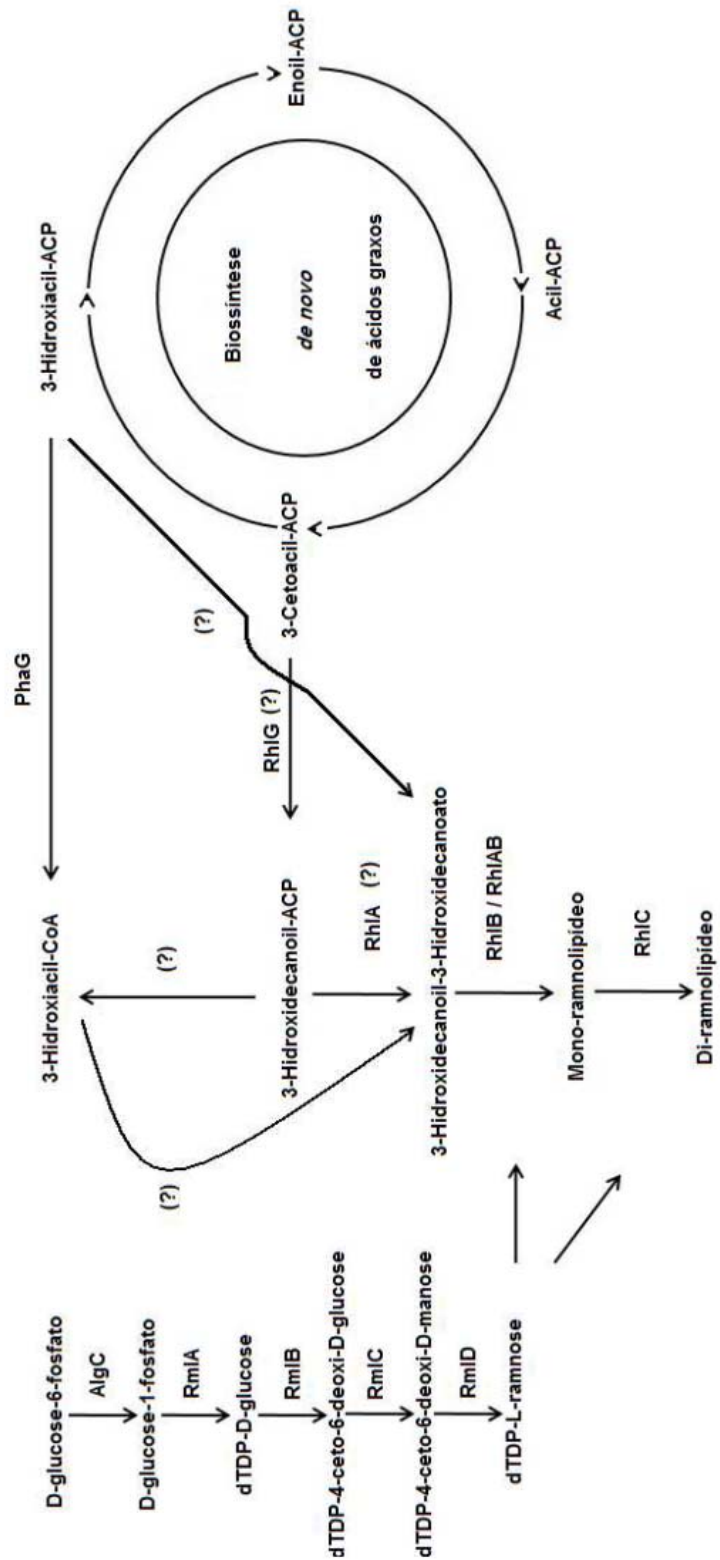
A síntese das porções hidrofóbica (lipídica) e hidrofílica (ramnosil) dos ramnolipídeos ocorre a partir do metabolismo primário, com a participação de grupos específicos de enzimas que atuam na síntese e também na regulação da produção dos RL (DESAI & BANAT, 1997; JOY *et al.*, 2017; LOVAGLIO *et al.*, 2015).

Os passos da biossíntese de ramnolipídeos foram inicialmente propostos por Burger *et al.* (1963) e compreendem três sequências de reações, catalisadas pelas enzimas RhIA, RhIB (ramnosiltransferase 1) e RhIC (ramnosiltransferase 2), onde a molécula dTDP-L-ramnose doa um grupo ramnosil para a molécula β -D-hidroxiálcanoiloxi- β -D-alcanoato (HAA) ou L-ramnosil- β -D-hidroxiálcanoiloxi- β -D-alcanoato (Mono-Ramnolipídeo) (BURGER *et al.*, 1963; JOY *et al.*, 2017; LOVAGLIO *et al.*, 2015) (Figura 3).

O primeiro passo da síntese dos ramnolipídeos envolve a síntese de seus precursores dTDP-L-ramnose e 3-hidroxiacil-3-hidroxiacilato (HAA) (LOVAGLIO *et al.*, 2015). Estes são unidos pela ação da enzima ramnosiltransferase 1 (RhIB), formando mono-ramnolipídeos (RL2) (JOY *et al.*, 2017; OCHSNER; FIECHTER; REISER, 1994; WITTGENS *et al.*, 2017). Parte destas moléculas é secretada, e outra recebe um segundo grupo ramnosil, pela ação da enzima ramnosiltransferase 2 (RhIC), originando di-ramnolipídeos (RL2- RL2) (JOY *et al.*, 2017; LOVAGLIO *et al.*, 2015; RAHIM *et al.*, 2001; WITTGENS *et al.*, 2017).

O conhecimento acerca da biossíntese de mono e di-ramno-mono-lipídeos, entretanto, ainda é escasso. Estudos indicam que pela ação da enzima RhIB uma molécula de dTDP-L-ramnose seja diretamente condensada com 3-hidroxiacil-ACP, gerando um mono-ramno-mono-lipídeo (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL 2005), que serviria de substrato para a enzima RhIC para originar di-ramno-mono-lipídeo (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005; WITTGENS *et al.*, 2017).

Figura 3 – Biossíntese dos ramnolípídeos.

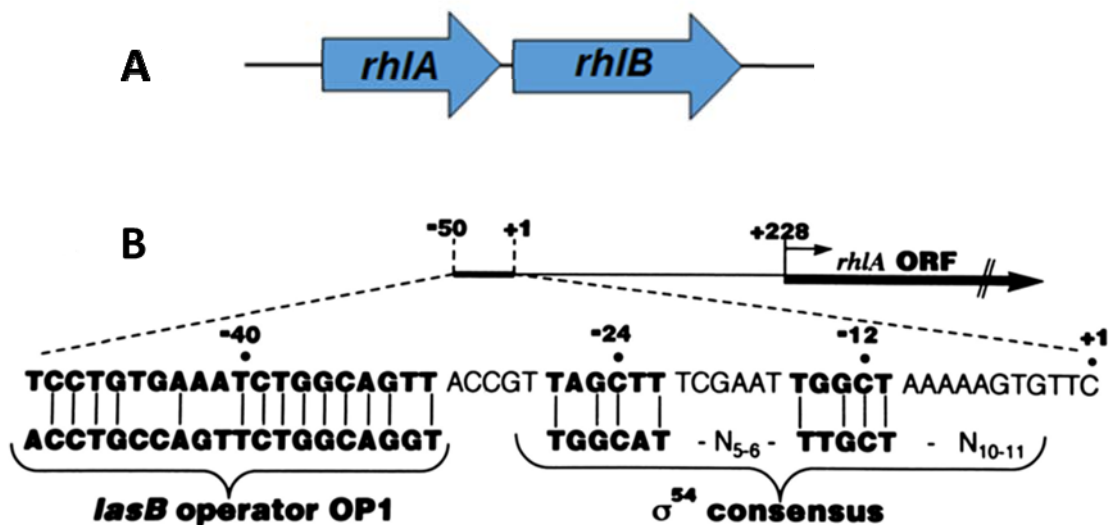


Fonte: CAMILIOS-NETO, 2010.

Os genes envolvidos na codificação das enzimas RhlA e RhlB encontram-se organizados em um operon bicistrônico (WITTGENS *et al.*, 2017), com regiões promotoras putativas do tipo σ^{54} e σ^{70} a montante ao local de início da transcrição de *rhlA* (PEARSON; PESCI; IGLEWSKI, 1997) (Figura 4).

Apesar dos genes serem transcritos de forma conjunta, estudos apontam que as respectivas proteínas exercem suas funções de modo independente. Déziel *et al.* (2003), por meio de estudos com mutantes *rhlA* e mutante *rhlB*, evidenciaram que deleção no gene *rhlA* ocasionou a não produção de HAA e ramnolípideos, enquanto que deleção do gene *rhlB* levava a não produção de ramnolípideos, porém não afetava a excreção de HAA.

Figura 4 – Operon *rhlA-rhlB*: (a) esquema do operon *rhlA-rhlB*; (b) região promotora putativa σ^{54} do operon *rhlA-rhlB*.

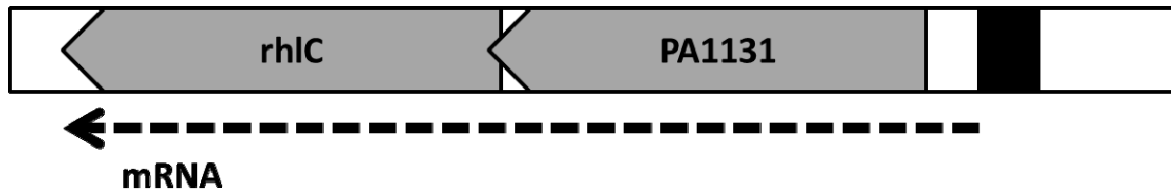


Fonte: Adaptado de PEARSON; PESCI; IGLEWSKI, 1997.

O gene *rhlC*, responsável pela codificação da enzima RhlC, encontra-se em uma região cromossômica diferente dos demais genes *rhl* (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005). Este organiza-se em um operon bicistrônico com o gene a montante PA1131, de função desconhecida (Rahim *et al.*, 2001; SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005), apresentando um único sítio de início de transcrição (RAHIM *et al.*, 2001) (Figura 5).

No caso do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, os operons *rhl* são transcricionalmente regulados por sistemas de sinalização, sendo um destes o sistema de *quorum-sensing* (QS) (WITTGENS *et al.*, 2017).

Figura 5 – Operon PA1131-*rhlC*.



Fonte: Adaptado de RAHIM *et al.*, 2001.

A biossíntese da dTDP-L-ramnose tem como precursor a glucose-1-fosfato, e ocorre em uma sequência de cinco reações catalisadas pelas enzimas Alg C, RmlA, RmlB, RmlC e RmlD, sendo as últimas quatro codificadas pelo operon *rmIBCAD* (MAIER; SOBERÓN-CHAVÉZ, 2000; SOBERÓN-CHAVÉZ; LÉPIN; DÉZIEL, 2005) (Figura 3)

A fração lipídica dos ramnolipídeos, por sua vez, é originada diretamente da biossíntese *de novo* dos ácidos graxos (Figura 3) (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998; DÉZIEL *et al.*, 2003; LOVAGLIO *et al.*, 2015; MAIER; SOBERÓN-CHAVÉZ, 2000; SOBERÓN-CHAVÉZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005). Todavia o intermediário desviado desta via e a enzima envolvida nesse processo ainda não são bem elucidados (CAMILIOS-NETO, 2010).

Alguns estudos apontam a enzima RhIG como a responsável pela retirada do precursor da fração lipídica da molécula de ramnolipídeos da via de síntese de ácidos graxos (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998). Esta enzima, homóloga à ceto-acil-reductase dependente de NADPH, converteria 3-cetoacil-ACP em 3-hidroxicanoil-ACP, e este a HAA pela ação da enzima RhIA (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998; JOY *et al.*, 2017).

Estudos realizados por Zhu e Rock (2008), entretanto, indicam que a enzima RhIA é a provável enzima responsável pela captação direta de β -hidroxiacil-ACP da biossíntese dos ácidos graxos. Segundo os autores β -hidroxiacil-ACP é o substrato preferido da enzima, uma vez que não se observa a produção de HAA quando β -

hidroxidecanoil-CoA é utilizado como substrato da enzima RhIA, mesmo em concentrações dez vezes superiores da mesma. Além disso, observaram que mutantes *rhIG*-negativos foram capazes de produzir ramnolipídeos em taxas equivalentes as cepas selvagens, indicando que a enzima RhIG provavelmente não apresenta efeito sobre a produção desse surfactante (ZHU; ROCK, 2008). Estes resultados mostraram-se condizentes com os obtidos por Bazire e Dufour (2014), onde observou-se que mutantes no operon *rhIG/PA3388*, *rhIG*-negativo, PA3388-negativo e duplo *rhIG/PA3388* não apresentaram efeito sobre a produção de ramnolipídeos e nem sobre fenótipos relacionados a produção de ramnolipídeos (produção de PQS, motilidade, formação de biofilme).

3.4 QUORUM-SENSING DE *Pseudomonas aeruginosa*

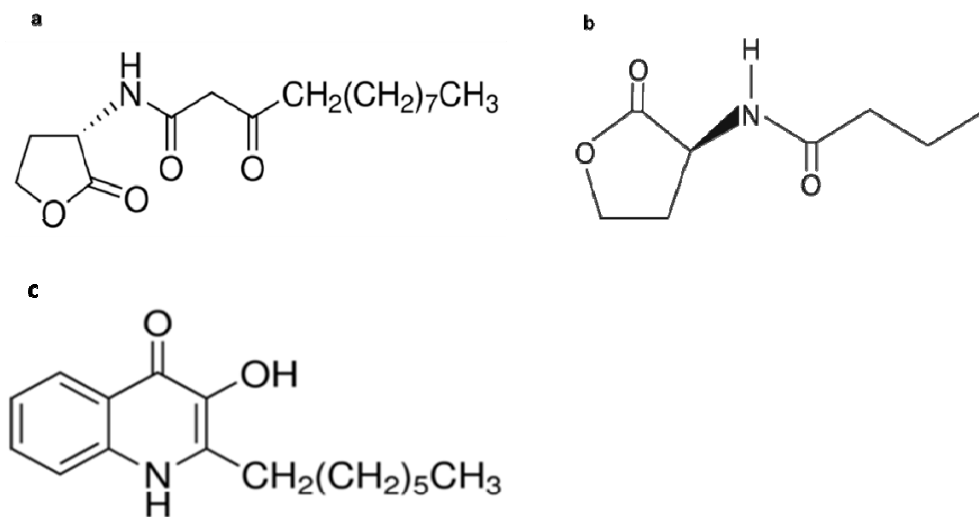
O sistema *quorum-sensing* (QS) é o principal sistema de comunicação química bacteriana utilizado para controlar coletivamente comportamentos de grupo. Neste sistema a bactéria produz, libera e detecta moléculas sinalizadoras difusíveis, denominadas auto-indutores, que permitem a coordenação do comportamento do grupo. Assim, o sistema QS permite que as bactérias percebam a densidade da população bacteriana e, através dessa informação, possam regular a expressão de vários genes (O'LOUGHLIN *et al.*, 2013).

Dentre os genes controlados em nível transcricional por este sistema, tem-se os genes associados ao desenvolvimento de biofilme e produção de diversos fatores de virulência, como a produção de ramnolipídeos (LIN CHUA *et al.*, 2017; RAMPIONI *et al.*, 2016; SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005).

No QS de *Pseudomonas aeruginosa* existem duas moléculas sinalizadoras do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL): N-(3-oxododecanoil)-HSL (3-oxo-C12-HSL) (Figura 6A) e N-butilil-HSL (C4-HSL) (Figura 6B), produzidas pelas enzimas LasI e RhII, respectivamente, assim como moléculas sinalizadoras do tipo 2-alkyl-4-quinolone (AQ). A sinalização AQ utiliza 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) (Figura 6C) e seu precursor imediato, 2-heptil-4-quinolona (HHQ) (LAMARCHE; DÉZIEL, 2011; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013). Estes sinalizadores ligam-se aos relativos fatores de transcrição (LasR, RhIR e MvfR), ativando assim a expressão dos genes alvos (Figura 7) (OCHSNER & REISER, 1995; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013). Os circuitos que

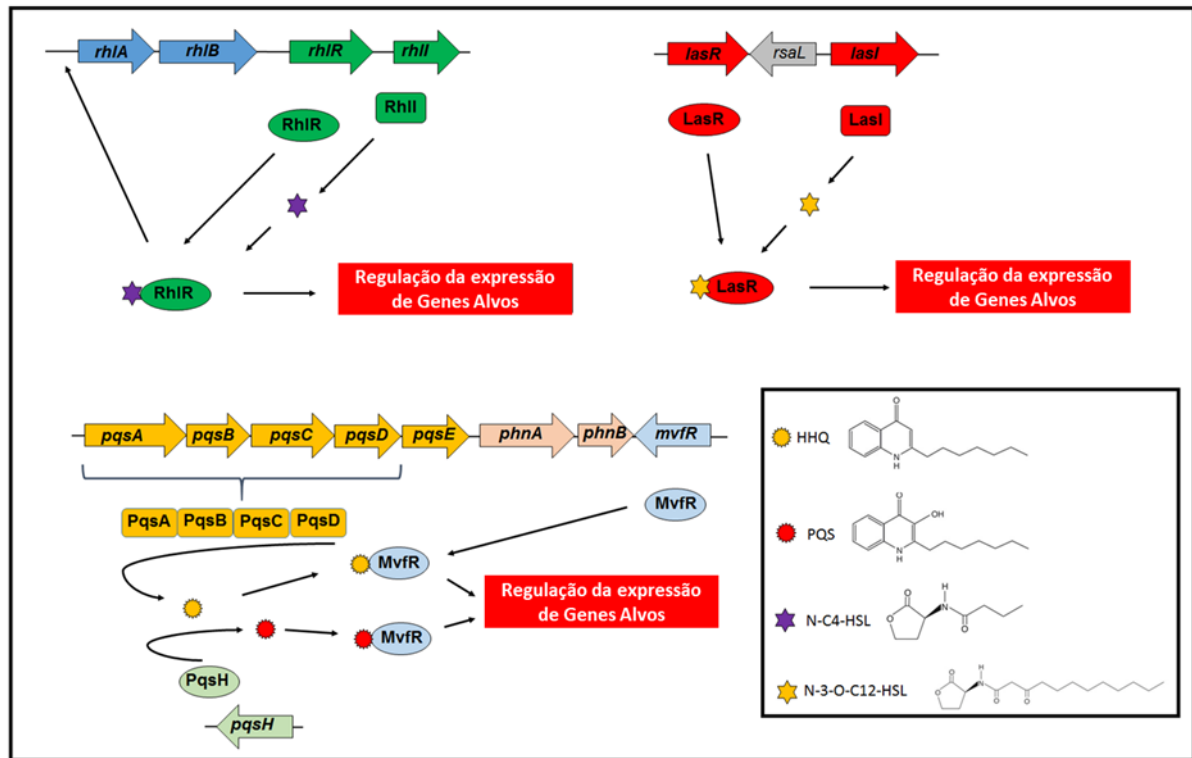
utilizam acil-HSL são comuns em bactérias gram-negativas, porém com moléculas distintas para diferentes bactérias, enquanto que o circuito que utiliza as AQ é exclusivo de *Pseudomonas aeruginosa*. Os circuitos *rhl*, *las* e *pqs* são arranjados hierarquicamente, de modo que exercem influência na regulação de um sobre o outro.

Figura 6 – Estrutura das moléculas de acil-homoserinolactonas: **(a)** N-(3-oxododecanoil)-HSL e **(b)** N-butiril-HSL. **(c)** estrutura molecular da quinolona (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona).



Fonte: **(a)** Sigma Aldrich; **(b)** Cayman Chemical; **(c)** Sigma Aldrich.

Figura 7 – Quorum-sensing de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: O autor.

Análises do transcriptoma de *Pseudomonas aeruginosa* em resposta ao sistema de quorum-sensing revelaram que cerca de 6% do genoma deste microrganismo é ativado ou reprimido pelos sistemas *lasIR* ou *rhlIR* (MEDINA *et al.*, 2003). Estes dois sistemas, que se encontram em regiões cromossômicas distintas (JOY *et al.*, 2017), ativam a transcrição dos genes alvos por meio da ligação a uma região conservada do DNA, denominada “*las box*”, comum a todos genes quorum-sensing regulados (MEDINA *et al.*, 2003).

Os complexos RhIR-C4-HSL e LasR-3-oxo-C12-HSL são capazes de controlar os seus próprios circuitos por meio da indução da produção de seus respectivos indutores de ativação (LAMARCHE; DÉZIEL, 2011; MAURA *et al.*, 2016), mas também ativam e inibem a expressão de outros genes (TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

LasR-3-oxo-C12-HSL controla positivamente os sistemas RhlIR e AQ estimulando a expressão de *rhlI* e *rhlR*, e *mvfR*, *pqsH* e *pqsL*, respectivamente (ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010; JOY *et al.*, 2017; LAMARCHE; DÉZIEL,

2011; MAURA *et al.*, 2016; MEDINA *et al.*, 2003; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013). A regulação da produção de MvfR por este sistema ocorre durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, de modo que nos estágios posteriores a regulação de *mvfR* torna-se independente de LasR (MAURA *et al.*, 2016).

O sistema *las* é ainda capaz de regular o sistema *rhl* em nível pós traducional. A molécula sinalizadora 3-oxo-C12-HSL liga-se a RhIR, dificultando a ligação de C4-HSL a este regulador transcricional, até que C4-HSL e/ou RhIR sejam produzidos em concentração suficiente para superar o efeito de bloqueio (JOY *et al.*, 2017).

A regulação do sistema *las*, por sua vez, é coordenada por um regulador global da expressão de fatores de virulência (Vfr), sintetizado pela expressão do gene *vfr*, o qual ativa a transcrição do gene *lasR* (CRODA-GARCÍA *et al.*, 2011)

O sistema *rhl*, por outro lado, é composto por quatro genes, *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* e *rhlI*, sendo os dois primeiros responsáveis pela síntese de enzimas da biossíntese de ramnolipídeos e os dois últimos componentes do circuito de *quorum-sensing*. Apesar de serem transcritos na mesma direção (5'-*rhlABRI*-3'), *rhlA-rhlB*, *rhlR* e *rhlI* apresentam regiões promotoras distintas (CRODA-GARCÍA *et al.*, 2011; JOY *et al.*, 2017; MEDINA *et al.*, 2003; THOMPSON *et al.*, 2003).

O complexo RhIR-C4-HSL induz a expressão de *rhlC* e *rhlAB* (AGUIRRE-RAMÍREZ *et al.*, 2012; JOY *et al.*, 2017; MAURA *et al.*, 2016; MEDINA *et al.*, 2003; SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005), responsáveis pela síntese de ramnosiltransferase 2 e ramnosiltransferase 1, respectivamente; sendo que este pode também ser regulado positivamente por LasR-3-O-C12-HSL, porém em nível consideravelmente inferior ao constatado pelo complexo RhIR-C4-HSL (MEDINA *et al.*, 2003).

A biossíntese de ramnose também sofre influência do QS. O operon *rmIBDAC*, é positivamente regulado pelo complexo RhIR-C4-HSL, por meio da ligação deste a uma "las box" atípica encontrada na região promotora deste operon (AGUIRRE-RAMÍREZ *et al.*, 2012), assim como a enzima AlgC, envolvida na primeira etapa da síntese de dTDP-L-ramnose (HENTZER *et al.*, 2003; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013; OLVERA *et al.*, 1999; SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003).

Diferentemente o sistema *las*, em que seu mecanismo de regulação depende da formação do complexo LasR-3-oxo-C12-HSL (MEDINA *et al.*, 2003), no sistema *rhl* o fator de transcrição RhIR é capaz de regular sozinho a expressão de genes alvo. Na ausência do sinalizador C4-HSL, RhIR atua como repressor de *rhlR* e *rhlAB*

(AGUIRRE-RAMÍREZ *et al.*, 2012; MEDINA *et al.*, 2003; SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005), de modo que a indução dos promotores desses genes é dependente da razão RhIR / RhIR-C4-HSL (MEDINA *et al.*, 2003). RhIR apresenta também papel importante na regulação do sistema AQ, por meio inibição direta da expressão do operon *pqsABCDE* e do gene *mvfR* (MAURA *et al.*, 2016; PAPENFORT; BASSLER, 2016).

Apesar da proteína RhIR ativar a expressão dos seus genes alvo quando associado ao autoindutor C4-HSL, isto pode também ser observado quando este fator transcricional encontra-se ligado a molécula sinalizadora 3-O-C12-HSL (JOY *et al.*, 2017).

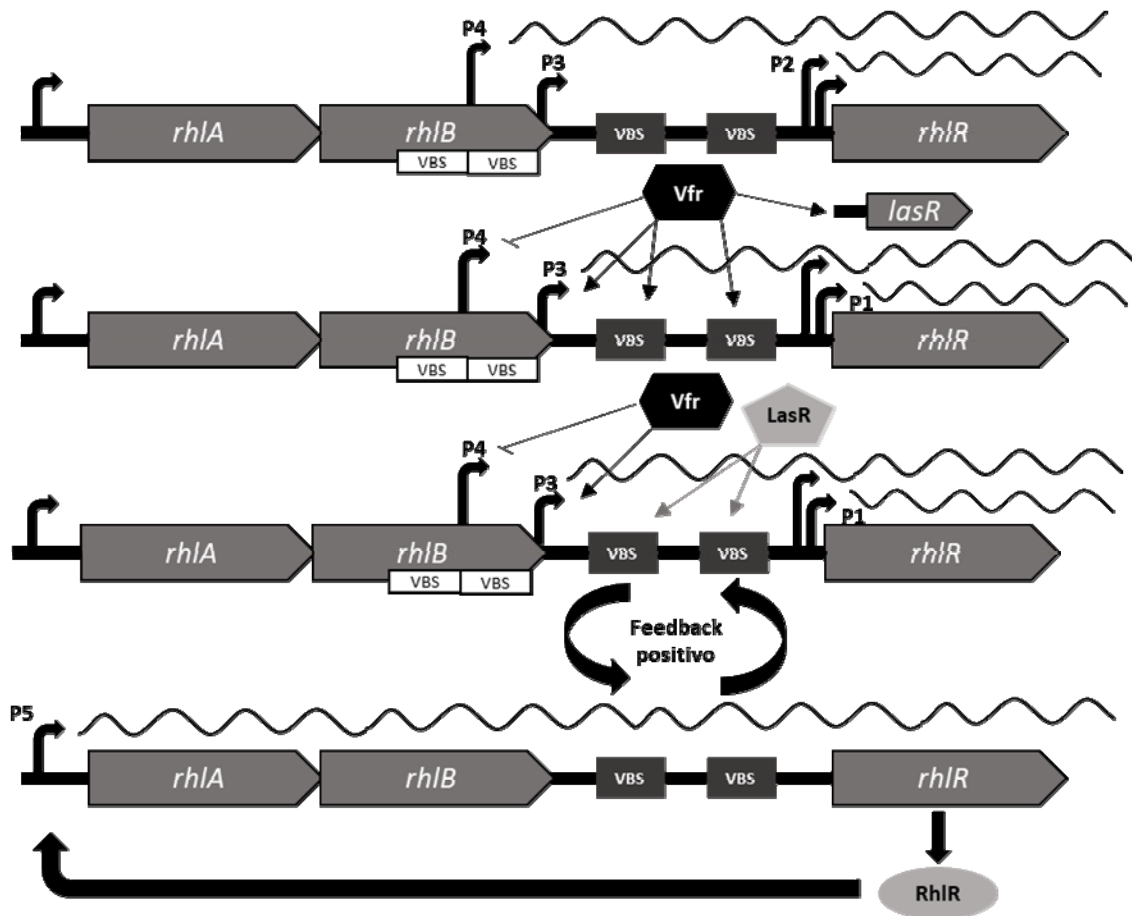
O gene *rhIR* possui quatro regiões promotoras, cada uma regulada de modo distinto; sendo duas destas situadas dentro da região codificadora do gene *rhIB*. A regulação positiva pelo complexo LasR/3-O-C12-HSL ocorre pela ligação no promotor 1 e provavelmente no promotor 4. O promotor 2 encontra-se envolvido com a transcrição constitutiva do gene *rhIR*, enquanto que o promotor 3 é regulado indiretamente pelo fator sigma RpoN (Figura 8) (CRODA-GARCÍA *et al.*, 2011).

Devido à localização dos promotores 3 e 4 dentro da região codificadora de *rhIB*, o gene *rhIR* pode ser expresso pela ativação da região promotora do operon *rhIAB*, produzindo um loop de autorregulação positiva (Figura 8) (CRODA-GARCÍA *et al.*, 2011)

A síntese de RhIR pode também ser regulada pela proteína Vfr, uma vez que quatro sítios funcionais de ligação para Vfr (sítios VBS) são encontrados ao longo das regiões promotoras de *rhIR*. Dentre esses sítios VBSs três regulam positivamente a transcrição de *rhIR* e um negativamente (Figura 8) (CRODA-GARCÍA *et al.*, 2011).

Pelo fato de duas regiões VBS se sobreporem parcialmente aos sítios de ligação do complexo LasR/3-O-C12-HSL, pode-se observar um efeito sinérgico de regulação por dois sistemas diferentes nessas regiões (CRODA-GARCÍA *et al.*, 2011).

Figura 8 – Modelo esquemático da regulação das regiões promotoras do gene *rhIR*.



Fonte: Adaptado de CRODA-GARCÍA *et al.*, 2011.

O sistema *pqs*, por sua vez, compreende quatro unidades de transcrição, sendo o operon *pqsABCDE* e o gene *pqsR* agrupados no mesmo locus, e *pqsH* e *pqsL* localizado a certa distância a jusante do operon *pqsABCDE* (Figura 9) (RAMPIONI *et al.*, 2016).

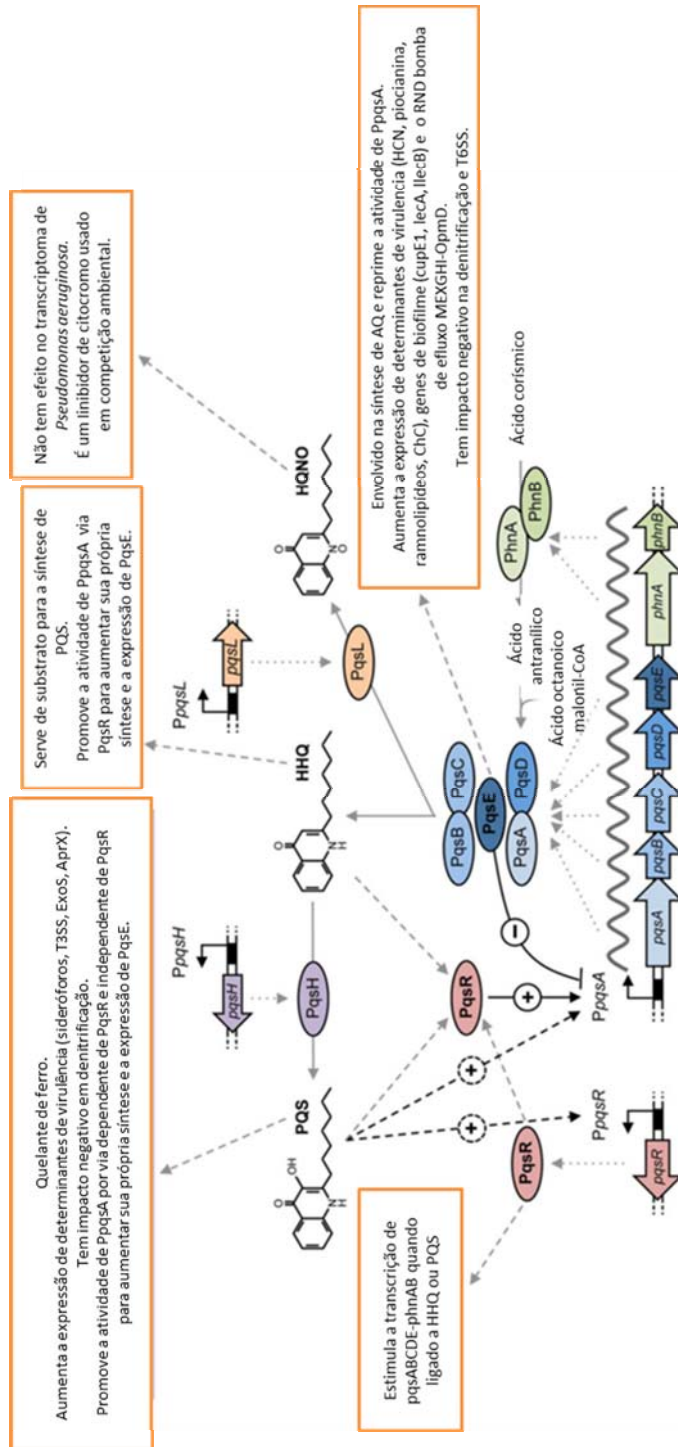
Os genes estruturais para o PQS são codificados por um operon de cinco genes *pqsABCDE*, sendo os quatro primeiros genes neste locus requeridos para a síntese da molécula HHQ, o qual é oxidado a PQS pela ação da monooxigenase *PqsH* (GALLAGHER *et al.*, 2002; RAMPIONI *et al.*, 2010). O gene *pqsE*, por sua vez, tem a função putativa de resposta celular a molécula PQS, facilitando a adaptação ambiental de *Pseudomonas aeruginosa* (RAMPIONI *et al.*, 2010). Uma segunda monooxigenase, *PqsL*, juntamente com os produtos da expressão de *pqsABCD*, é responsável pela síntese de HQNO, um inibidor de citocromo com importante função em situações de competição ambiental (RAMPIONI *et al.*, 2016).

Os autoindutores PQS e HHQ regulam positivamente operon *pqsABCDE-phnAB*, quando associados ao regulador transcricional MfvR (CAO *et al.*, 2001; GALLAGHER *et al.*, 2002; MAURA *et al.*, 2016; MCGRATH *et al.*, 2004; PUSTELNY *et al.*, 2009; RAMPIONI *et al.*, 2010; RAMPIONI *et al.*, 2016). Esse complexo regula também o sistema *rhl* pela ativação da expressão dos genes *rhlI* e *rhlR* (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

Na ausência de MfvR, PQS é capaz de estimular a expressão do operon *pqsABCDE-phnAB* por via independente de PqsR, mecanismo que ainda não é bem compreendido (RAMPIONI *et al.*, 2016).

A proteína PqsE induz a expressão de *rhlAB*, regulando positivamente a síntese de ramnolipídeos. Por outro lado inibe o operon *pqsABCDE-phnAB*, reduzindo a produção de HHQ e sua própria síntese (RAMPIONI *et al.*, 2016).

Figura 9 – Modelo esquemático da regulação do sistema AQ.



Fonte: Adaptado de RAMPIONI et al., 2016.

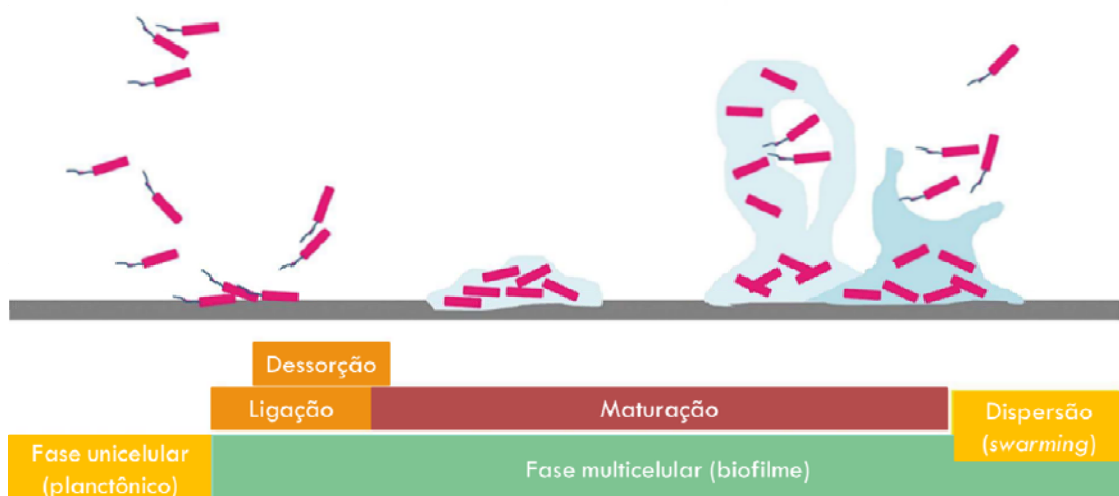
3.5 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS, FORMAÇÃO DE BIOFILME E CIRCUITO DE *QUORUM-SENSING*

A produção de ramnolipídeos e o circuito de *quorum-sensing* já foram descritos por apresentarem estreita relação com o crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na forma de biofilme (DAVEY *et al.*, 2003; RAMPIONI *et al.*, 2016; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2017).

Biofilmes são comunidades microbianas associadas à superfície inerte ou orgânica, envoltas por uma matriz extracelular composta por diversas moléculas tais como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, e outras macromoléculas e compostos químicos (DAVEY *et al.*, 2003; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015) (Figura 10). Esta forma de crescimento é dependente do tamanho populacional e da capacidade de cada célula em detectar e responder a estímulos das demais células (DAVEY *et al.*, 2003).

Os biofilmes bacterianos formam estruturas complexas na forma de cogumelos e pilares, contendo poros e canais (ZHENG *et al.*, 2017) (Figura 10). Esses poros e canais permitem um fluxo de fluidos ao longo do biofilme; os quais distribuem nutrientes e oxigênio para as células e removem produtos metabólicos finais e resíduos (DAVEY *et al.*, 2003; PAMP, 2007).

Figura 10 – Ciclo de vida da bactéria: da fase unicelular (planctônica) à fase multicelular (biofilme).



Fonte: Adaptado de BERLANGA; GUERRERO, 2016.

Os ramnolípídeos apresentam papel importante na formação de biofilmes iniciais e manutenção de biofilmes estruturados de *Pseudomonas aeruginosa* (estrutura na forma de colunas e abertura dos canais e poros), além de atuar na dispersão de células de biofilmes maduros (*swarming*) (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2017). O mecanismo pelo qual esse biossurfactante age nessa estrutura ainda não é bem esclarecido, de modo que sua função pode estar associada apenas a aspectos físicos, pela redução da tensão superficial; ou biológico, desencadeando eventos de sinalização química (ZHENG *et al.*, 2017).

O circuito de *quorum-sensing* já foi descrito como um dos sistemas responsáveis pela regulação da maturação dessa forma de crescimento microbiano. A proteína PqsE, pertencente a sinalização AQ, regula positivamente os genes *cupE1*, *lecA* e *lecB*, envolvidos na formação do biofilme (RAMPIONI *et al.*, 2016). O complexo *lasR-lasI* do sistema las, por sua vez, atua nos últimos estágios da diferenciação do biofilme; porém os produtos genéticos específicos gerados pela ação desse complexo durante esse processo são desconhecidos (DAVEY *et al.*, 2003).

Atualmente a maioria dos estudos desenvolvidos acerca da produção de ramnolípídeos utiliza como plataforma fermentativa os cultivos submersos. Estes por sua vez, enfrentam dificuldades operacionais devido à formação de espuma durante o processo fermentativo em virtude da aeração forçada dos cultivos. Os cultivos na forma de biofilme, por utilizarem baixa ou ausência de sistemas de aeração, podem surgir como uma alternativa para a produção deste biossurfactante. Esta plataforma fermentativa, entretanto, ainda é muito pouco explorada tanto em escala laboratorial quanto industrial, de modo que o processo de produção de ramnolípídeos por esta ainda precisa ser otimizado.

As razões moleculares que justificam a utilização desta plataforma para a produção de ramnolípídeos por *Pseudomonas aeruginosa* baseiam-se em uma aparente relação direta entre formação de biofilme, ativação do QS e produção de ramnolípídeos, uma vez que, i) a produção de ramnolípídeos por biofilme apresenta maiores taxas de produção comparada ao cultivo submerso clássico; ii) a produção de ramnolípídeos e o desenvolvimento de biofilme são reguladas pelo *quorum-sensing*; e iii) o desenvolvimento de biofilmes maduros é dependente de ramnolípídeo.

Deste modo, os cultivos na forma de biofilme mostram-se como uma plataforma fermentativa interessante para a produção deste biossurfactante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

Foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, originalmente isolada na Austrália a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). PAO1 é a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais, apresentando adicionalmente o genoma sequenciado, publicado (STOVER *et al.*, 2000) e muito bem anotado.

4.2 MEIOS DE PRESERVAÇÃO

A cepa PAO1 foi mantida em meio Luria-Bertani (LB) (Tabela 3) adicionado de glicerol (20 %, v/v), e estocada a -80 °C. Esta foi transferida para placas contendo meios sólidos contendo LB e 1,5 % (m/v) de ágar (LA), e incubados em estufa bacteriológica por 24 h a 37 °C antes de ser utilizada para o preparo do pré-inóculo (item 4.3).

Tabela 3 - Meio Luria-Bertani (LB) (pH 7)

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	10

4.3 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio Luria- Bertani (LB) (Tabela 3). O microrganismo preservado em meio LA (item 4.2) foi primeiramente ativado em meio LB por 12h – 16h a 37 °C e 200 rpm

(Pré-Inóculo 1). Em seguida, 500 µL da suspensão de células bacterianas foi inoculada em 25 mL de meio LB (2 % v/v) e incubada a 37 °C de 5 – 6 h sob agitação de 200 rpm (Pré-Inóculo 2). O crescimento bacteriano durante o preparo do pré-inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm ($D.O_{600\text{ nm}}$), e utilizado como inóculo quando a $D.O_{600\text{ nm}}$ atingiu leitura entre 0,6 e 0,8.

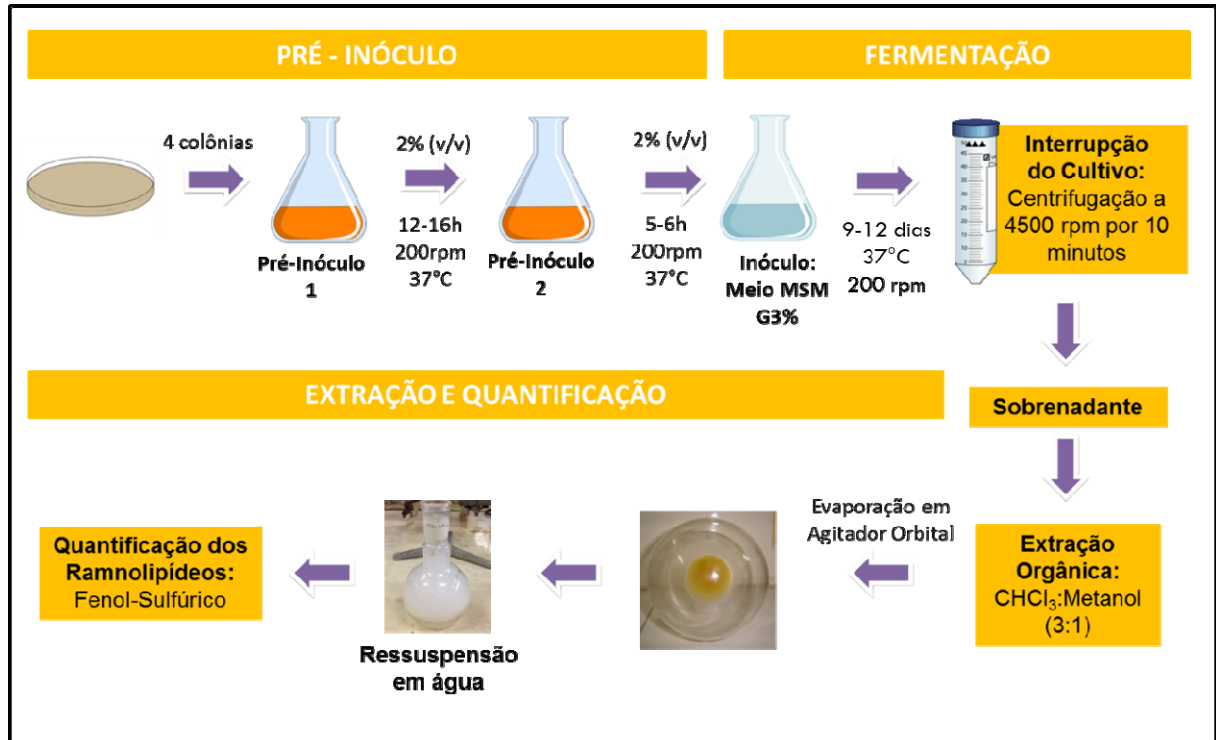
4.4 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os ensaios para Fermentação Submersa (FS) foram realizados em frascos Erlenmeyer 125 mL, contendo 25 mL de meio de sais acrescentado de glicerol (3% v/v) (Tabela 4). Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.3) em uma proporção de 2 % v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital rotatório a 37 °C nas agitações de 200 rpm (aerobiose) ou 60 rpm (microaerofilia). Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos, no tempo de fermentação oportuno, e submetidos à extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) com posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2) (Figura 11).

Tabela 4 - Meio de Sais (CAMILIOS-NETO, 2010)

Componentes	Concentração (g/L)
KH_2PO_4	3
K_2HPO_4	7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$(NH_4)_2SO_4$	1
Glicerol	3 % (v/v)

Figura 11 – Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa.



Fonte: O autor

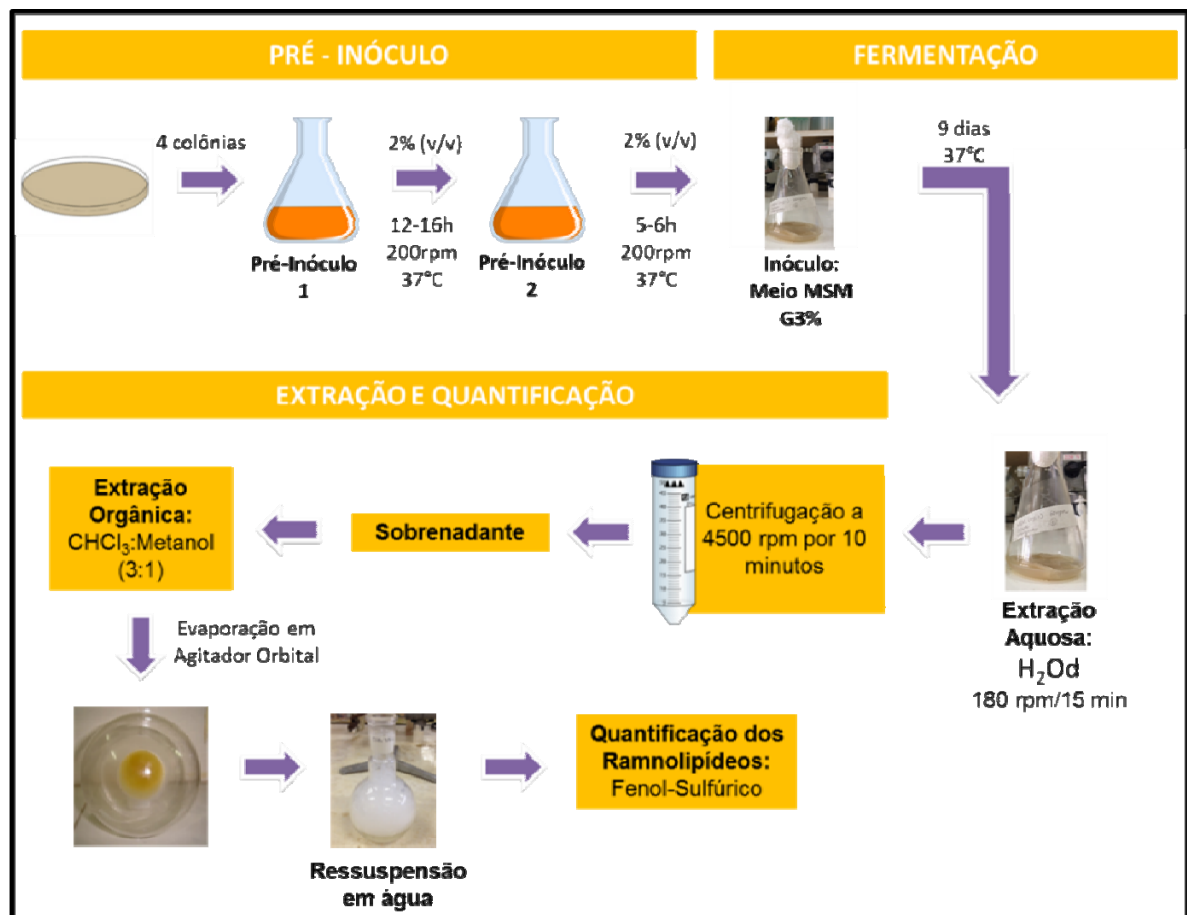
4.5 DEFINIÇÃO DE MODELO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa*

4.5.1 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa com Presença de Suporte Sólido Inerte

Os ensaios para Fermentação Submersa com Presença de Suporte Sólido Inerte (FSE-SSI) foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 0,5 g de suporte inerte; sendo este gaze, algodão ou lã de vidro. Os suportes foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.3) em uma proporção de 2 % de volume de pré-inóculo (item 4.3) (D.O._{600 nm} entre 0,6 e 0,8) em volume de solução umedecedora. A solução umedecedora, constituída de meio de sais acrescentado de glicerol (3 % v/v) (Tabela 4) foi adicionada aos substratos sólido nos volumes de 20 mL para gaze, 25 mL para lã de

vidro e 30 mL para algodão. Os meios sólidos inoculados foram incubados em agitador orbital rotatório a 37 °C, por 9 dias, nas agitações de 200 rpm, 60 rpm ou estático. Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação adequado, submetidos à extração aquosa seguida de centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos e extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) com posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2) (Figura 12).

Figura 12 – Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa com presença de suporte sólido inerte.



Fonte: O autor.

4.5.2 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Semissólida Estática em Sistema de Difusão Controlada de Nutrientes

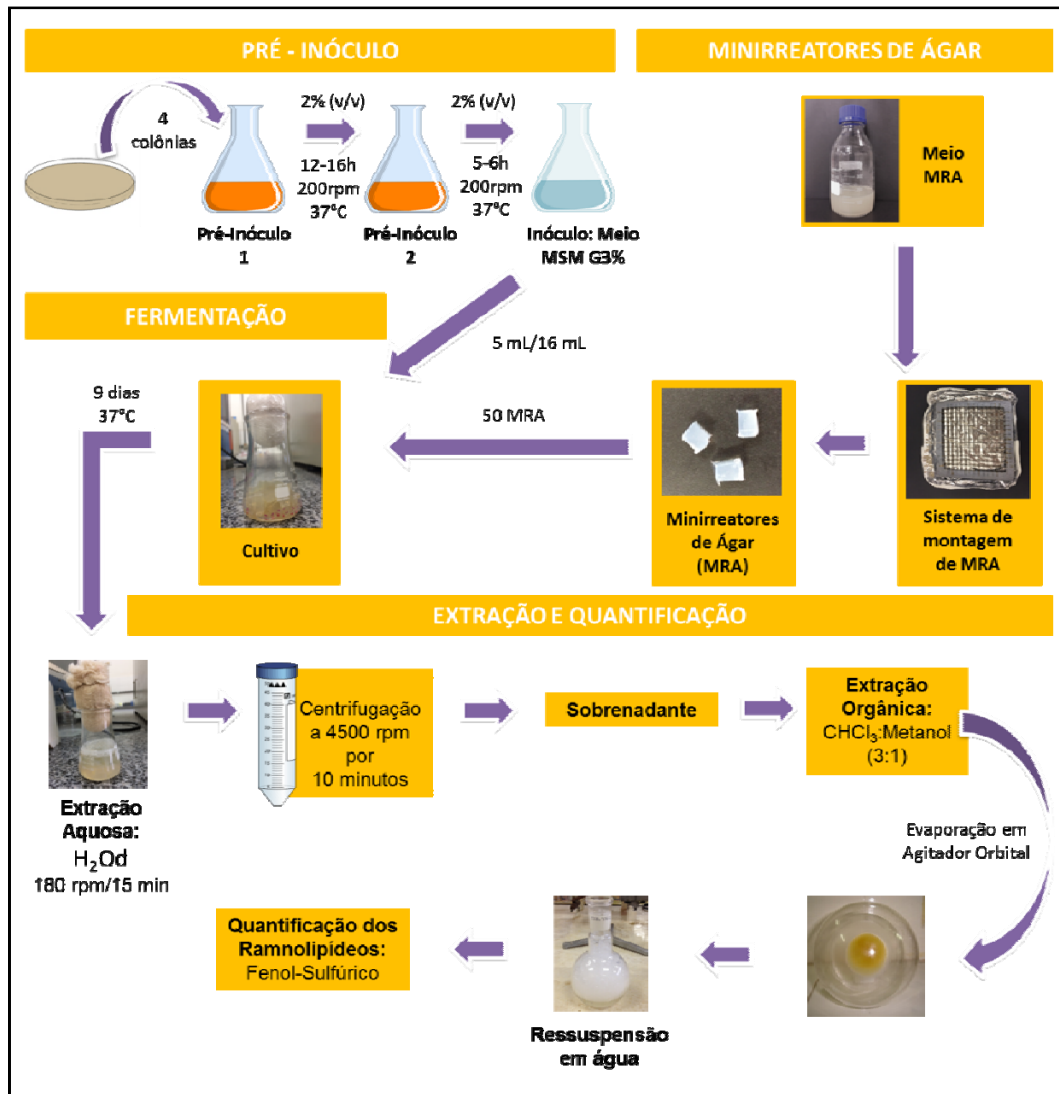
4.5.2.1 Cultivos de Fermentação Semissólida Estática em sistema de difusão controlada de nutrientes

Os ensaios de fermentação semissólida estática (FSSE) em minirreatores de ágar [(MRA) - (FSSE-MRA)] foram realizados em frascos Erlenmeyer de 80 mL, contendo volume de 5 mL ou 16 mL de meio de sais acrescentado de glicerol (3 % v/v) (Tabela 4) e 50 Minirreatores de Ágar (MRA) (Figuras 13 e 14C).

Os diferentes cultivos avaliados variaram quanto à composição dos MRA, sendo estes: (1) ágar 1,5 % em água; (2) ágar 1,5 % (m/v) em meio de sais adicionado de glicerol 3 % (v/v) (MSM G3); (3) ágar 1,5 % (m/v) em meio de sais adicionado de glicerol 6 % (v/v) (MSM G6); (4) ágar 1,5 % (m/v) em meio de sais adicionado de glicerol 3 % (v/v) + torta de milho 10 % (MSM G3/TM); (5) ágar 1,5 % (m/v) em meio de sais adicionado de glicerol 3 % (v/v) + torta de milho 10 % + óleo de soja 1 % (MSM G3/TM+OS).

Os cultivos foram inoculados com volume de 2 % (v/v) de pré-inóculo (item 4.3) e incubados em estufa bacteriológica em temperaturas de 37 °C por 9 dias. Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação oportuno, submetidos à extração aquosa seguida de centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos e extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) e posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (Figura 13) (item 4.7.3.2).

Figura 13 – Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolídeos obtidos por fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes.



Fonte: O autor.

4.5.2.2 Montagem dos Minirreatores de Ágar

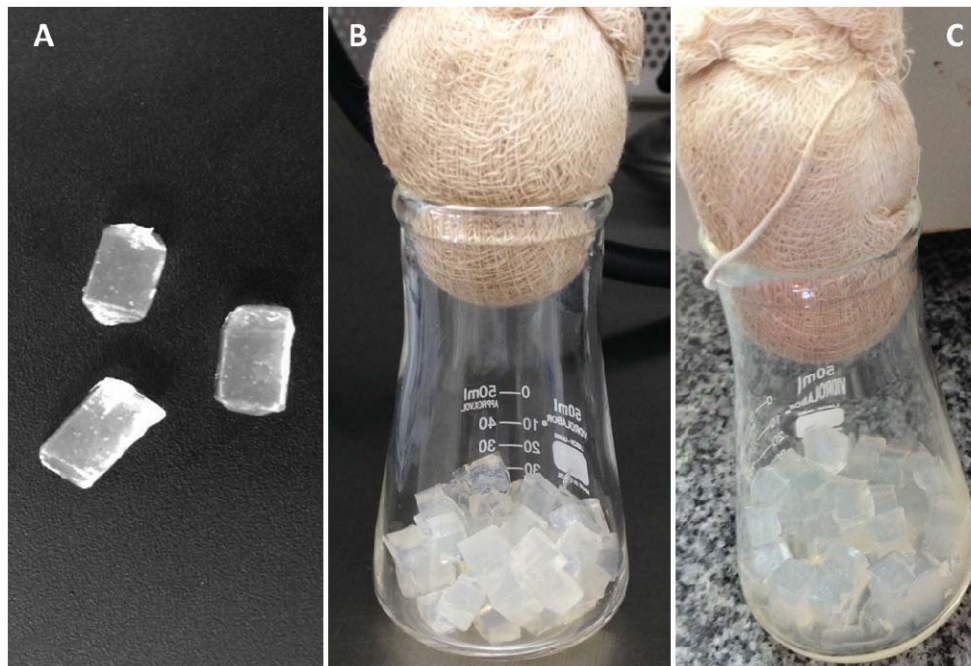
A figura 13 traz um esquema ilustrativo da montagem dos Minirreatores de Ágar (MRA). Cortadores de legumes comerciais, contendo 196 câmaras com dimensões médias de 0,6 cm de largura, 0,6 cm de comprimento e 0,8 cm de altura, foram utilizados como molde para a produção dos MRA.

Estes foram previamente autoclavados e apoiados em formas de alumínio esterilizadas, constituindo assim o sistema de montagem de minirreatores de ágar.

Sobre este sistema foram vertidos 100 mL dos respectivos meios de cultivo previamente esterilizados por autoclavagem durante 20 minutos a 121 °C. Após solidificação, os minirreatores formados foram separados do sistema (Figura 14A) e adicionados aos respectivos cultivos (Figura 14B).

Ao final do processo cada MRA apresentou uma área de 0,175 - 0,252 cm³, sendo constituídos por cerca de 320 µL de meio sólido cada (Figura 14A), de modo que cada cultivo apresentou um volume final de 16 mL de meio sólido (Figura 14 B-C).

Figura 14 – (A) Minirreatores de ágar; (B) Erlenmeyer contendo os minirreatores de ágar; (C) Cultivo com minirreatores de ágar.



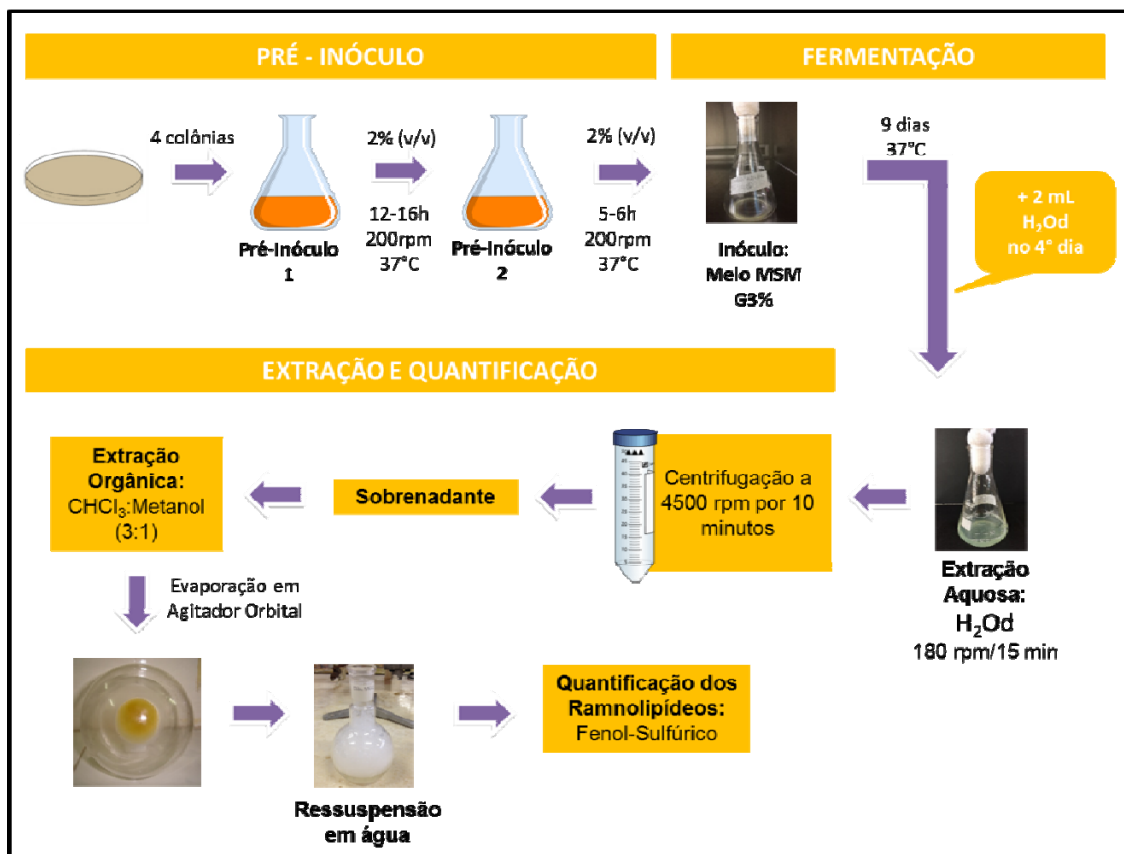
Fonte: O autor.

4.5.3 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática de Leite Raso

Os ensaios para Fermentação Submersa Estática de Leite Raso foram realizados em frascos Erlenmeyer 125 mL, contendo 3 mL de meio de sais acrescentado de glicerol (3 % v/v) (Tabela 4). Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.3) em uma

proporção de 2 % v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital rotatório a 37 °C nas agitações de 60 rpm ou estático, por 9 dias. No quarto dia de cultivo, adicionou-se 2 mL de água destilada autoclavada aos cultivos visando evitar a secagem dos mesmos. Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação oportuno, submetidos à extração aquosa, seguida de centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos e extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) com posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2) (Figura 15).

Figura 15 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática de leite raso.

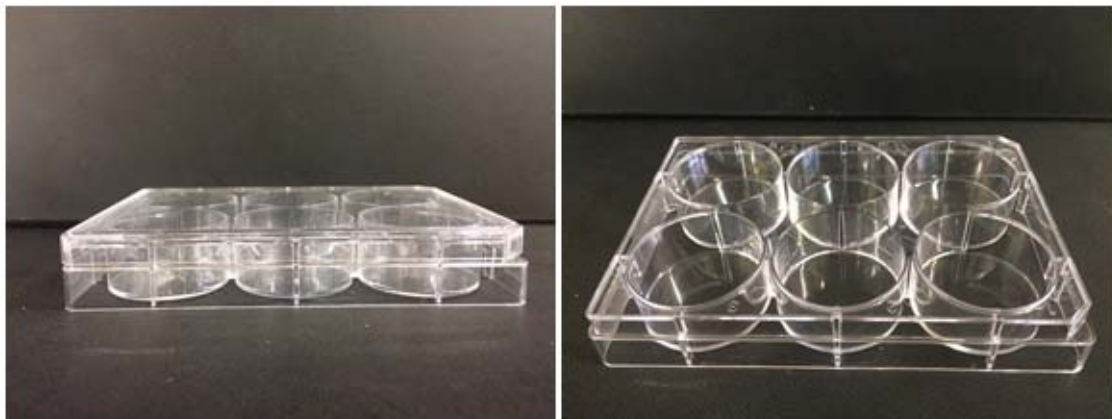


Fonte: O autor.

4.5.4 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática em Placas de Cultivo Celular

Os ensaios foram realizados em placas de cultivo celular de fundo chato estéreis, contendo 6 poços com capacidade de 17 mL cada (Figura 16). Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.3) em uma proporção de 2 % v/v. Aos poços das placas de cultivo celular adicionaram-se os seguintes volumes de meio de cultivo previamente inoculado: 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL, 1,25 mL, 1,5 mL, 1,75 mL e 2 mL. As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica em temperaturas de 37 °C por 9 dias. No quarto dia de cultivo, adicionou-se, quando necessário, água destilada autoclavada aos cultivos visando evitar a secagem dos mesmos (Tabela 5) (Figura 17). Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação oportuno, submetidos à extração aquosa seguida de centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos e extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) com posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2) (Figura 17).

Figura 16 - Placas de cultivo celular.

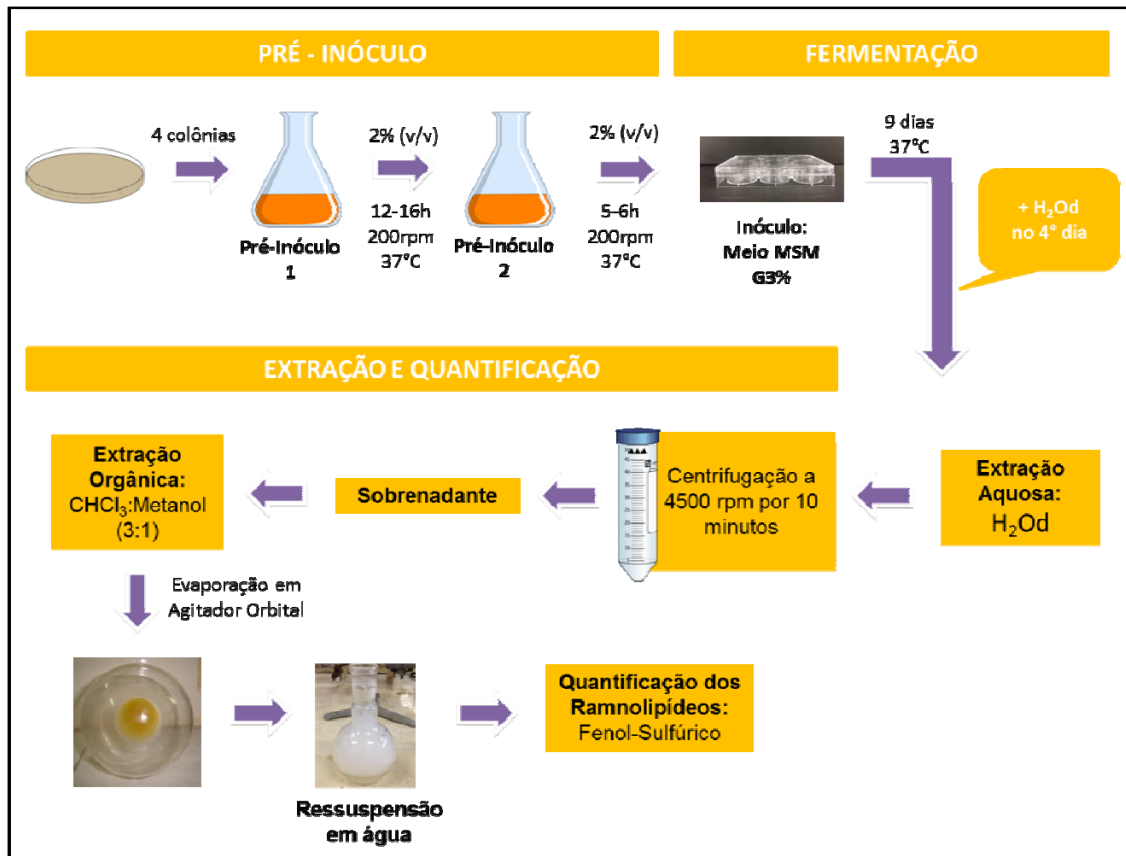


Fonte: O autor.

Tabela 5 - Volumes dos cultivos, por poços, realizados em placa de cultivo celular.

Volume inicial de meio (mL)	Volume de água adicionado no 4º dia de cultivo (mL)
0,5	1
0,75	1
1	1
1	0,5
1,25	0,5
1,25	0,25
1,5	1
1,5	-
1,75	1
1,75	-
2	2
2	-

Figura 17 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática em placas de cultivo celular.



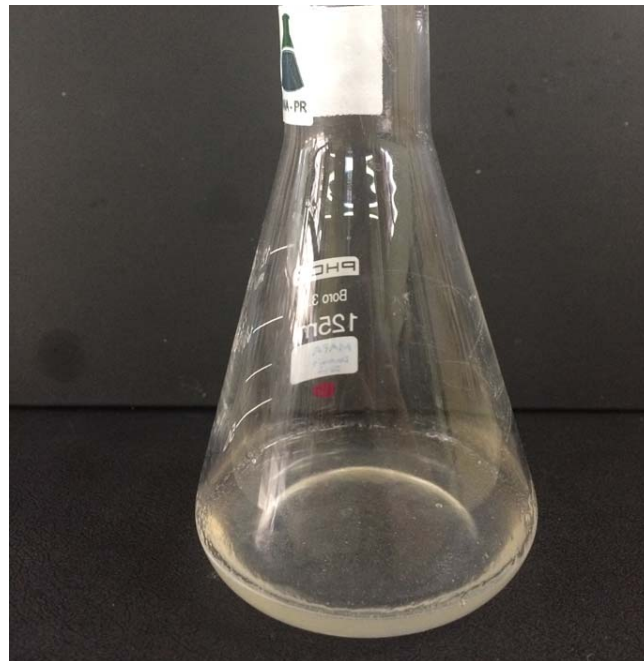
Fonte: O autor.

4.5.5 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática de Leito Raso com Membrana de Ágar

Os ensaios para Fermentação Submersa Estática de Leito Raso foram realizados em frascos Erlenmeyer 125 mL de fundo redondo e fundo chato, contendo membrana de ágar composta por 5 mL de solução de ágar 2 % (m/v) (Figura 18). Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com 3 mL de meio de sais acrescentado de glicerol (3 % v/v) (Tabela 4) adicionado do pré-inóculo (item 4.3) em uma proporção de 2 % v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital rotatório a 37 °C por 9 dias. No quarto dia de cultivo, adicionou-se 2 mL de água destilada autoclavada aos cultivos

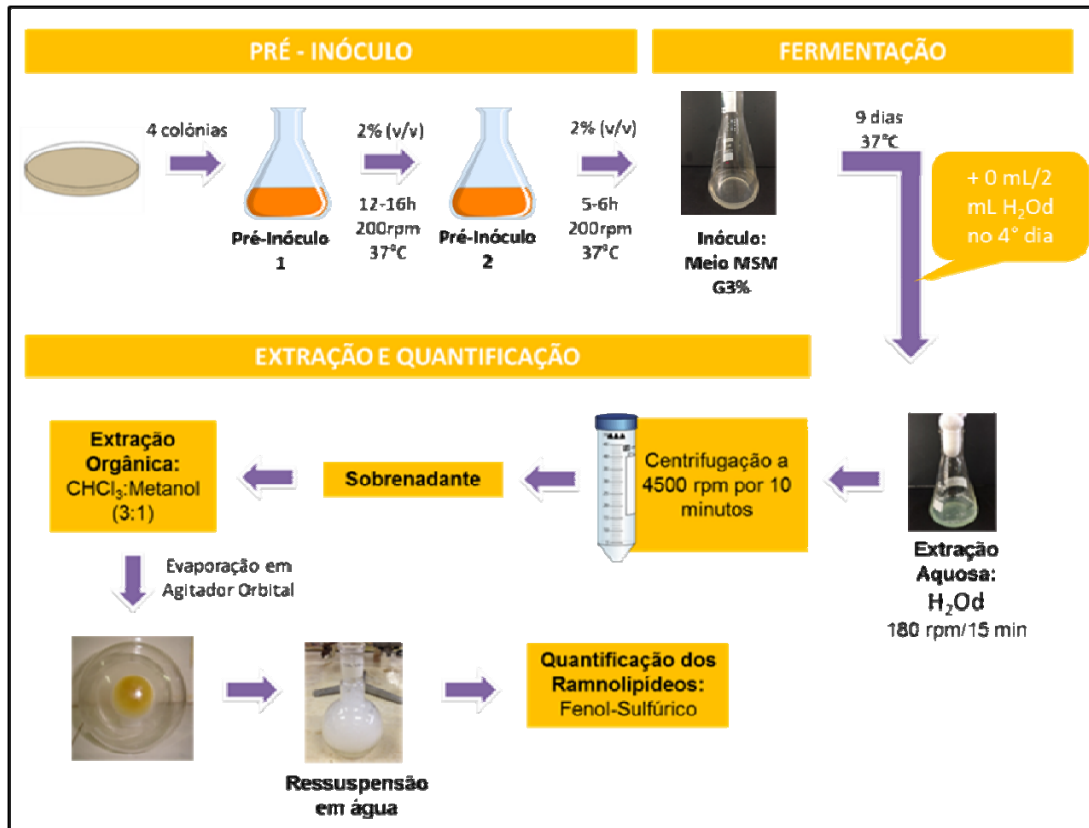
visando evitar a secagem dos mesmos, também foram feitos controles sem a adição de água. Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação oportuno, submetidos à extração aquosa seguida de centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos e extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) com posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2) (Figura 19).

Figura 18 – Cultivo por fermentação submersa estática de leito raso com membrana de ágar.



Fonte: O autor.

Figura 19 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática de leite raso com membrana de ágar.



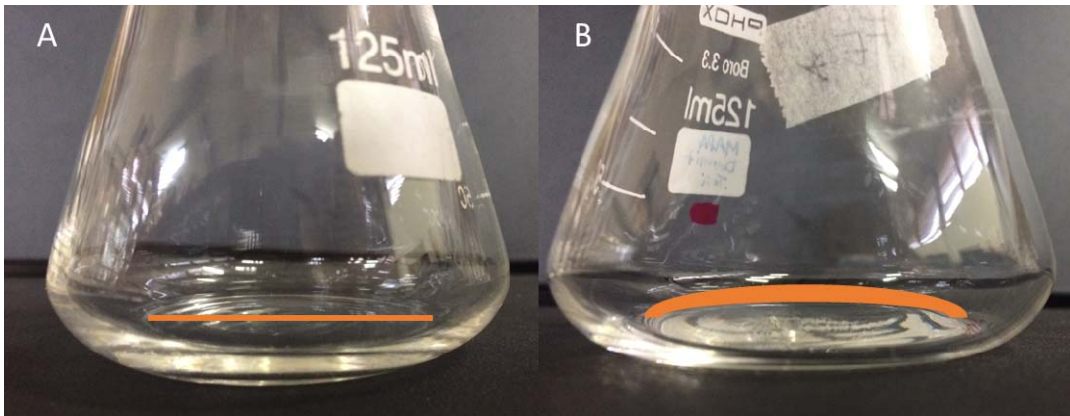
Fonte: O autor.

4.5.6 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática de Leite Raso em Erlenmeyer de diferentes formatos

Os ensaios para Fermentação Submersa Estática de Leite Raso foram realizados em frascos Erlenmeyer 125 mL de fundo redondo e fundo chato (Figura 20), contendo 3 mL de meio de sais acrescentado de glicerol (3 % v/v) (Tabela 4). Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.3) em uma proporção de 2 % v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital rotatório a 37 °C por 9 dias. No quarto dia de cultivo, adicionou-se 1 mL ou 2 mL de água destilada autoclavada aos cultivos visando evitar a secagem dos mesmos, também foram feitos controles sem a adição de água. Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação oportuno,

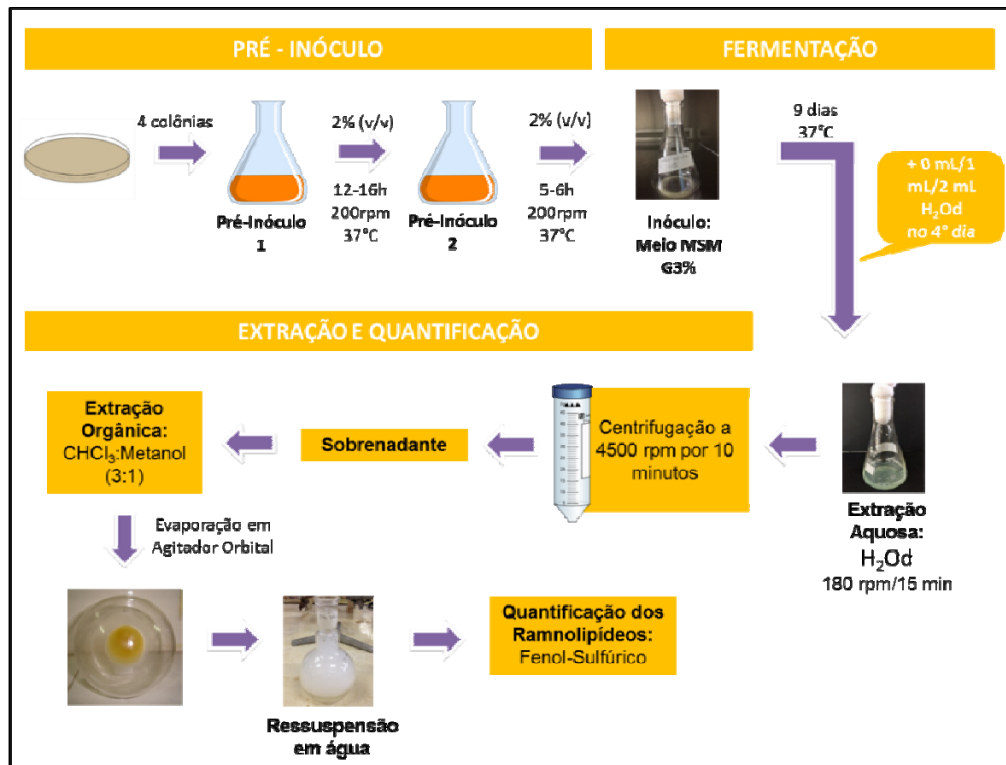
submetidos à extração aquosa seguida de centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos e extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) com posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2) (Figura 21).

Figura 20 – (A) Erlenmeyer de fundo reto e (B) Erlenmeyer de fundo abaulado.



Fonte: O autor.

Figura 21 - Modelo esquemático do processo de produção, extração e quantificação de ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa estática de leito raso em erlenmeyers de diferentes formatos.



Fonte: O autor

4.5.7 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática de Leito Raso em Erlenmeyer de fundo abaulado

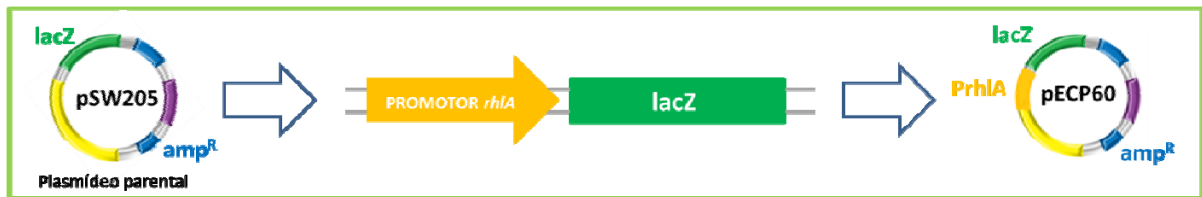
Os ensaios para Fermentação Submersa Estática de Leito Raso (FSELR) foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL de fundo redondo, contendo 3 mL de meio de sais acrescentado de glicerol (3 % v/v) (Tabela 4). Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.3) em uma proporção de 2 % v/v. Os meios inoculados foram incubados em estufa bacteriológica em temperaturas de 37 °C, por 9 dias ou 12 dias. No quarto dia de cultivo, 2 mL de água destilada autoclavada foram adicionadas aos cultivos visando evitar a secagem dos mesmos. Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação oportuno, submetidos à extração aquosa seguida de centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos e extração orgânica dos ramnolipídeos (item 4.7.3.1) com posterior quantificação indireta pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2).

4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CULTIVOS SUBMERSOS E CULTIVOS SUBMERSOS ESTÁTICOS DE LEITO RASO EM ERLLENMEYER DE FUNDO ABAULADO

4.6.1 Avaliação dos Perfis de Transcrição por Fusão Transcricional: Montagem das Fusões Transcricionais e Ensaio de Atividade de β – Galactosidase

Para realização dos ensaios de fusão transcricional, os fragmentos de DNA contendo as regiões promotoras dos genes de interesse foram clonados em vetor parental (Tabela 6), contendo o gene repórter lacZ (Amp^R) (Figura 22). O nível de indução das regiões promotoras analisadas foi verificado através de ensaios de atividade de β -galactosidase (MILLER, 1992).

Figura 22 – Desenho ilustrativo da clonagem da região promotora do gene *rhIA* no plasmídeo parental pSW205.



Fonte: O autor.

4.6.1.1 Plasmídeos

Os plasmídeos pSW205 e pECP60 (Tabela 3) foram cedidos pelo laboratório do professor Everett Pesci (East Carolina University Department of Microbiology and Immunology).

Tabela 6 – Plasmídeos.

Plasmídeos	Gene	Vetor Parental	Antibiótico de Seleção
pSW205	Control translational <i>LacZ</i>	Parent	Ampicilina/Carbenicilina
pECP60	<i>rhIA-LacZ</i> translational	pSW205	Ampicilina/Carbenicilina

4.6.1.2 Estoque

Os plasmídeos foram extraídos, e transformados e mantidos em estirpes de *Escherichia coli*, no laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Estas foram armazenadas em glicerol 50 % a uma temperatura de -20 °C.

4.6.1.3 Manipulação de DNA

4.6.1.3.1 Extração de DNA plasmidial

Para a realização da extração plasmidial, 30 μL de células de *E. coli*, contendo os respectivos plasmídeos, foram inoculadas em 5 mL de meio LB (Tabela 6) adicionado do antibiótico ampicilina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubadas a 37 °C, 180 rpm por 16h. Alíquotas de 1,5 mL do cultivo de células foram coletadas em tubo eppendorf, centrifugadas a 14000 x g por um minuto, e o sedimento obtido ressuspensionado em 150 μL de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM; Tris HCl pH 8,0 25 mM). As células foram lisadas acrescentando 150 μL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M), e o pH neutralizado com 150 μL de KacF (acetato de Potássio 3 M, ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8). As células foram incubadas em gelo por 5 minutos, seguida da adição de 50 μL de fenol:clorofórmio:isoamílico (25:24:1). A mistura foi homogeneizada, centrifugada por sete minutos a 14000 x g, e um volume de 450 μL do sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf. O DNA obtido foi precipitado com etanol, seco em estufa a 30 °C e ressuspensionado em 25 μL de água ultra pura autoclavada.

4.6.1.3.2 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA obtidos na etapa de extração plasmidial foram analisados por meio de gel de agarose 1 %, em tampão TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualizados em transluminador de luz ultravioleta.

4.6.1.4 Transformação Bacteriana por Choque Térmico

4.6.1.4.1 Célula Competente

O microrganismo preservado em meio LA (item 4.2) foi inoculado em 25 mL de meio LB e incubado por 12 – 16 h a 37 °C e 200 rpm. Em seguida, 1000 μL da

suspensão de células bacterianas foi inoculada em 100 mL de meio LB (2 % v/v) e incubados a 37 °C, 200 rpm por 3 h (tempo necessário para o cultivo alcançar a D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6). O cultivo foi incubado em gelo por 30 minutos e em seguida centrifugado a 14000 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado. As células foram lavadas com 50 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M gelada, incubada por 10 minutos e centrifugadas a 14000 x g, por cinco minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e um volume de 200 µL de células (pellet ressuscitado) foi alíquotado em tubos eppendorf estéreis (um tubo por plasmídeos de interesse).

4.6.1.4.2 Transformação por Choque Térmico

Alíquotas de células competentes foram misturadas com 5 µL de plasmídeos intactos e incubadas em gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos eppenderfs contendo a mistura de DNA e células competentes foram transferidos para banho maria laboratorial a 42 °C por 60 segundos e imediatamente incubados em gelo por 5 minutos. Após recuperação em meio LB (Tabela 1) por uma hora, as células foram plaqueadas em meio LB adicionado de ágar (item 4.2) contendo os devidos antibióticos.

4.6.1.5 Ensaio de Atividade de β -galactosidase

A estirpe selvagem PAO1 foi transformada por choque térmico com plasmídeos contendo as regiões promotoras a serem avaliadas (pSW205 ou pECP60 – Tabela 5). As estirpes mutantes, preservadas em meio LA (item 4.2) adicionado do antibiótico Carbenicilina 200 µg/mL, foram primeiramente ativadas em 25 mL de meio LB contendo 100 µL do antibiótico Carbenicilina 200 µg/mL por 12 – 16 h a 37 °C e 200 rpm (Pré-inóculo 1). Em seguida, 500 µL da suspensão de células bacterianas foi inoculada em 25 mL de meio LB (2 % v/v) adicionado de 100 µL do antibiótico Carbenicilina 200 µg/mL e incubada a 37 °C de 5 – 6 h sob agitação de 200 rpm (D.O._{600 nm} entre 0,6 e 0,8) (Pré-inóculo 2). Uma proporção de 2 % (v/v) do pré-inóculo 2 foi inoculada nos ensaios de fermentação submersa e fermentação submersa estática de leite raso em erlenmeyer de fundo abaulado,

contendo 25 mL e 3 mL de meio de sais adicionado de glicerol (3 % v/v) respectivamente (Tabela 2) (itens 4.4.1 e 4.6.7)

As culturas foram incubadas nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h para o estudo dos perfis de expressão ao longo do tempo. Nos tempos oportunos, os cultivos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, e o pellet obtido ressuspendido em vórtex por 1 minuto com um volume de solução salina 0,9 % de 25 mL para os ensaios submersos e 3 mL para os ensaios submersos estáticos de leite raso (reconstituição do volume inicial de meio de cultivo). A ressuspensão obtida foi submetida ao ensaio de atividade de β -galactosidade para a avaliação do nível de indução das regiões promotoras analisadas (MILLER, 1992).

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação do Crescimento Bacteriano

O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm e por gravimetria.

4.7.2 Caracterização do Biofilme

A estrutura dos biofilmes foi verificada através de microscopia eletrônica de varredura a partir dos cultivos contendo suporte sólido utilizando a cepa PAO1. Após fixação em Karnovsky (paraformaldeído 2 %, glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato 0,1 M pH 7.2 a 4 °C) (KARNOVSKY, 1965). O material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida foi feita a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná e no microscópio Philips Quanta 200 (Centro de Microscopia da UEL). As amostras da superfície do biofilme foram obtidas em diferentes resoluções.

4.7.3 Quantificação dos Ramnolipídeos

4.7.3.1 Extração dos Ramnolipídeos

Os cultivos foram interrompidos, no tempo de fermentação oportuno, e submetidos à extração dos ramnolipídeos com água destilada em agitador orbital a 200 rpm, por 30 minutos em temperatura ambiente. Os extratos resultantes foram centrifugados a 12.500 g a 25 °C por 10 minutos e os sobrenadantes submetidos à extração orgânica com solução de clorofórmio/metanol ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) (3:1) adicionado de solução de KCl 15 % (v/v). As fases orgânicas, recuperadas por meio de funil de separação, foram concentradas em evaporador rotatório e os extratos resultantes solubilizados em água destilada para quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.7.3.2).

4.7.3.2 Dosagem de Ramnose pelo Método do Fenol-Sulfúrico

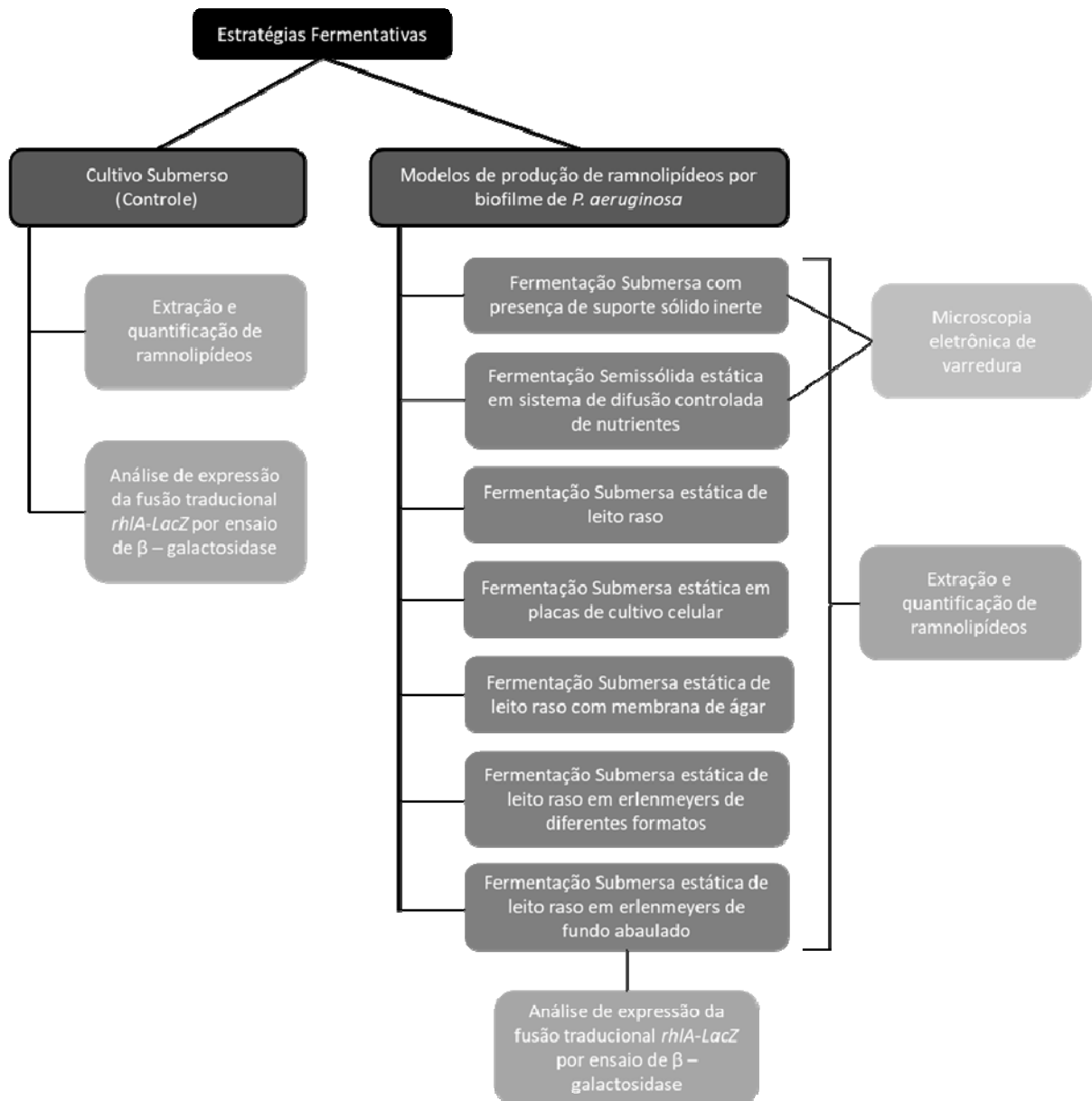
A determinação dos açúcares redutores totais, que possibilita a quantificação indireta dos ramnolipídeos, foi realizada pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando-se uma curva padrão de ramnose e leitura em espectrofotômetro a 480 nm (CAMILIOS-NETO, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DEFINIÇÃO DE MODELO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa*

A formação de biofilme está associada a adesão de uma população de microrganismos a uma superfície inerte ou orgânica formando estruturas complexas envoltas por uma matrix formada por polissacarídeos, proteínas e ácido nucleicos. Estas estruturas estão relacionadas com o arsenal de virulência do patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*. Entre os fatores de virulência desta bactéria estão os ramnolipídeos. Deste modo, baseados em uma possível relação positiva entre formação de biofilme e produção de ramnolipídeos o presente trabalho tratou do desenvolvimento de modelos, utilizando diferentes suportes sólidos, de modo a definir uma boa condição para se avaliar a produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 23). Os ensaios para Fermentação Submersa foram utilizados em todas as etapas do trabalho como controle, uma vez que está é a estratégia fermentativa mais aplicada para a produção do metabólito em escala laboratorial e industrial (Figura 23).

Figura 23 – Fluxograma das estratégias fermentativas avaliadas para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.



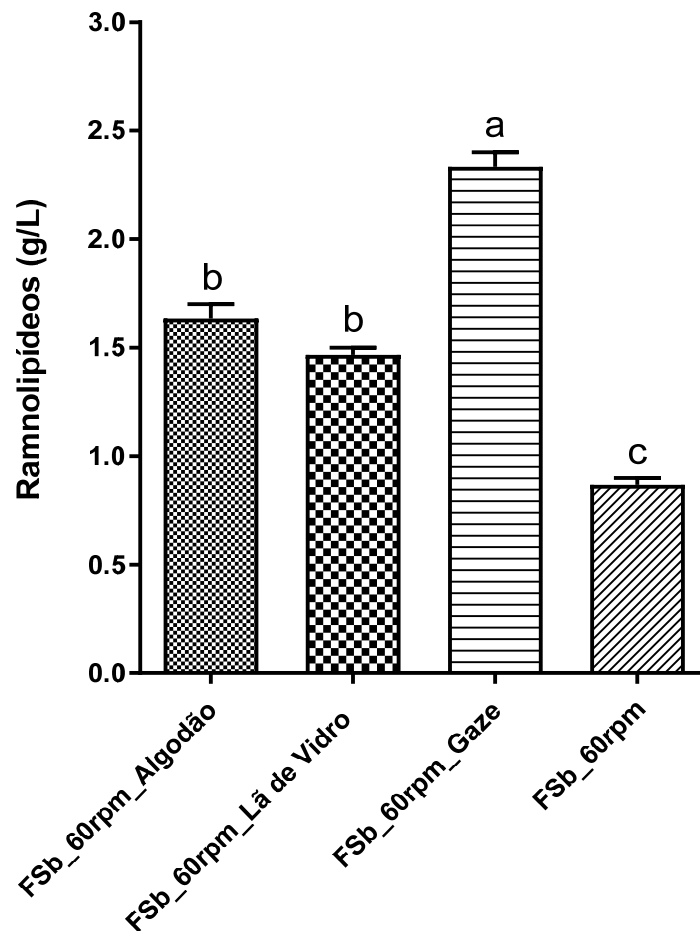
Fonte: O autor.

5.1.1 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa com Presença de Suporte Sólido Inerte

5.1.1.1 Efeito da presença de um suporte sólido inerte na produção de ramnolipídeos

Devido ao fato de cultivos com baixa agitação, portanto microaerófilos, estimularem o desenvolvimento de biofilmes de estrutura complexa (ZHENG *et al.*, 2017; DAVEY *et al.*, 2003), o primeiro bloco de experimentos deste trabalho foi realizado para avaliar o efeito da presença de diferentes suportes inertes, sendo estes algodão, gaze e lã de vidro, em cultivos microaerófilos (agitados a 60 rpm). Os ensaios foram comparados com cultivo submerso também microaerófilo (agitado a 60 rpm) (Figura 24).

Figura 24 - Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa com Presença de Suporte Sólido Inerte.

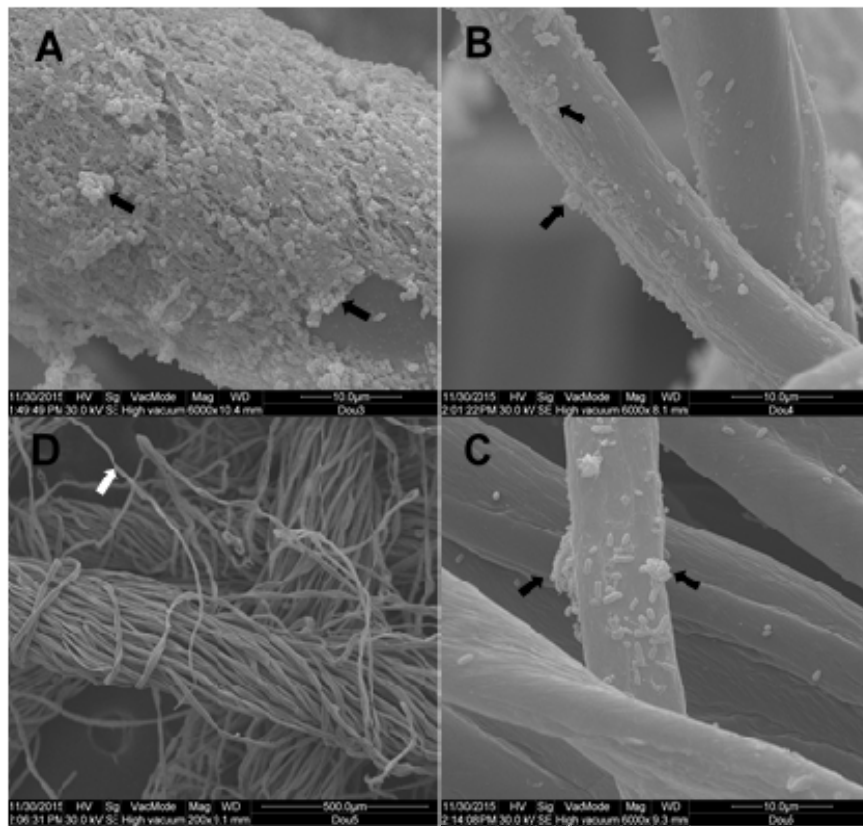


FSb_60rpm_Algodão, cultivo submerso microaerófilo na presença de 0,5 g de algodão; FSb_60rpm_Lã de Vidro, cultivo submerso microaerófilo na presença de 0,5 g de lã de vidro; FSb_60rpm_Gaze, cultivo submerso microaerófilo na presença de 0,5 g de gaze; FSb_60rpm, cultivo submerso microaerófilo sem a presença de matriz sólida de baixa interferência. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,001.

Os resultados indicaram que a inserção dos três diferentes suportes inertes avaliados culminou em um aumento significativo na produção de ramnolipídeos comparado a fermentação submersa (FSb_60rpm) ($p < 0,0005$), revelando que a presença de um suporte sólido estimula a síntese do metabólito pelo microrganismo

Pseudomonas aeruginosa. Estes resultados encontram-se de acordo com os obtidos com cultivo sólido, contendo bagaço de cana e torta de milho adicionados de glicerol e óleo de soja 6 % (v/v), que proporcionaram produções até 15 vezes superiores às obtidas por cultivo submerso com *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011). Dentre os suportes avaliados, a gaze (FSb_60rpm_Gaze) mostrou-se como material mais interessante para produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, alcançando produção média de 2,33 g/L, assim, este foi o modelo selecionado para o próximo bloco de experimentos. Quanto aos ensaios utilizando algodão (FSb_60rpm_Algodão) e lã de vidro (FSb_60rpm_Lã de Vidro), apesar de serem significativamente superiores aos resultados obtidos pela fermentação submersa microaerófila, estes foram também significativamente inferiores aos resultados obtidos com a gaze. Por outro lado, imagens de microscopia eletrônica de varredura apontam para um maior desenvolvimento de biofilme no cultivo com lã de vidro (Figura 25). Neste suporte inerte observa-se uma alta cobertura da fibra de lã de vidro por células de *Pseudomonas aeruginosa* envoltas por uma matrix. Embora haja essa diferença entre os suportes sólidos, pode-se observar a formação de estruturas na forma de colunas nas três condições avaliadas, indicando o estabelecimento de um possível biofilme nos três cultivos e justificando a escolha do modelo com gaze.

Figura 25 – Microscopia de Varredura em cultivos Submersos com Presença de diferentes Suportes Sólidos Inertes.



(A) Lã de vidro; (B) Algodão; (C e D) Gaze. Setas pretas: Estrutura de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Seta branca: Fibra de gaze.

5.1.1.2 Efeito da agitação e aeração do meio sobre a produção de ramnolipídeos em cultivo submerso na presença de gaze

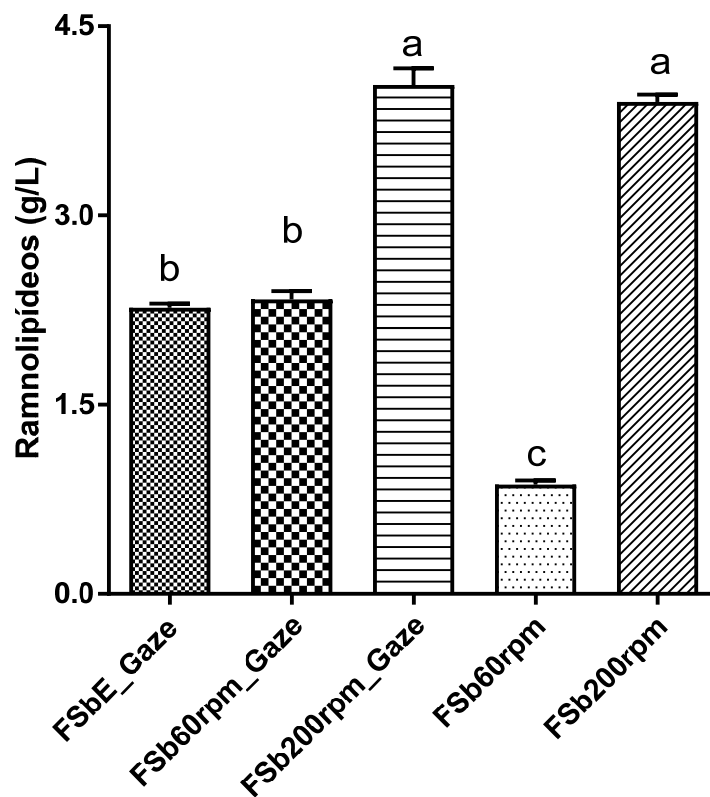
De modo a avaliar a potencial influência da agitação e aeração dos cultivos sobre a produção do biossurfactante, comparou-se cultivos submersos e submersos na presença de gaze sob as agitações de 60 rpm (microaerófilo), 200 rpm (aeróbio) ou estático (microaerófilo) (Figura 26).

Em relação a fermentação submersa com ausência de suporte sólido pode-se constatar um aumento significativo da produção de ramnolipídeos ao se elevar a agitação do cultivo de 60 rpm (FSb60rpm) para 200 rpm (FSb200rpm). Este resultado pode ser explicado pela provável baixa taxa de transferência de oxigênio no cultivo com baixa agitação, que culmina em uma diminuição do rendimento

produção, devido à baixa capacidade fermentativa deste microrganismo (WU *et al.*, 2017).

Quanto aos cultivos com gaze, os ensaios estáticos (FSbE_Gaze) e com agitação de 60 rpm (FSbE60rpm_Gaze) apresentaram produções estatisticamente idênticas; entretanto ambos diferiram estatisticamente do cultivo com agitação de 200 rpm (FSbE200rpm_Gaze), que apresentou um incremento de aproximadamente duas vezes na produção do surfactante (Figura 26). Por outro lado, os cultivos submerso e submerso na presença de gaze, ambos na agitação de 200 rpm, não apresentaram diferença estatística, entre eles, na produção das moléculas avaliadas. Estes resultados sugerem que, nas condições avaliadas, a variável influenciadora da produção de ramnolipídeos é a agitação/aeração e não a presença do suporte sólido.

Figura 26 - Avaliação do efeito da agitação/aeração na produção de ramnolipídeos em cultivo submerso na presença de gaze.



FSbE_Gaze, cultivo submerso estático na presença de 0,5g de gaze como suporte sólido; FSb60rpm_Gaze, cultivo submerso microaerófilo na presença de 0,5g de gaze como suporte sólido; FSb200rpm_Gaze, cultivo submerso na presença de 0,5g de gaze como

suporte sólido; FSb60rpm, cultivo submerso microaerófilo ausente de suporte sólido; FSb200rpm, cultivo submerso ausente de suporte sólido. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,05.

Estudos de otimização da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em cultivos submersos vêm demonstrando que a elevação da agitação e aeração do cultivo apresenta efeito positivo na produção de ramnolipídeos (EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016; WEI; CHOU; CHANG, 2005; ZHU *et al.*, 2012). Zhu *et al.* (2012), em estudo com *Pseudomonas aeruginosa* O-2-2, mostraram que o aumento da agitação de 180 rpm para 500 rpm resultou em um incremento de aproximadamente cinco vezes na produção de ramnolipídeos (ZHU *et al.*, 2012); enquanto Wei, Chou e Chang (2005) constataram um aumento de quase 80% da produção do biossurfactante ao elevar a agitação de 50 rpm para 200 rpm, em cultivo com *Pseudomonas aeruginosa* J4.

Deste modo, este modelo (desenvolvimento de biofilme em matriz inerte) não se mostrou adequado para a avaliação comparativa da produção de ramnolipídeos por fermentação submersa clássica e por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1.2 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Semissólida Estática em Sistema de Difusão Controlada de Nutrientes

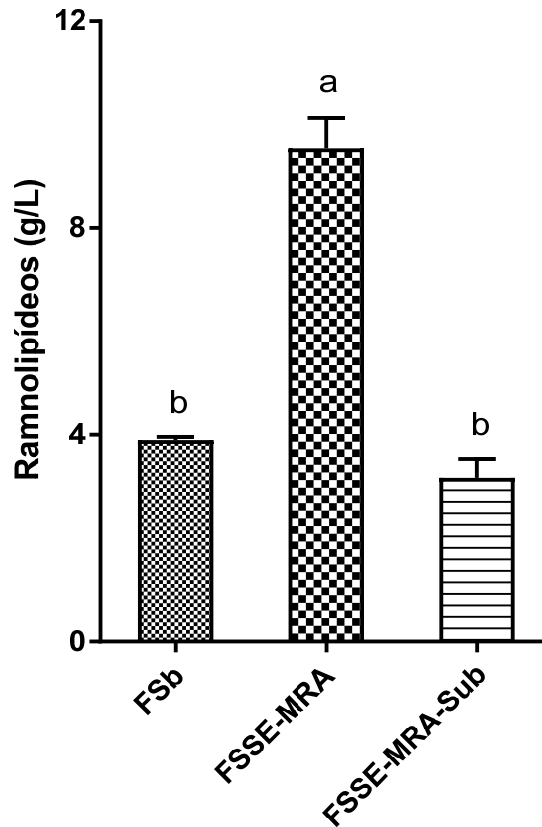
Os próximos blocos de experimentos tratam do desenvolvimento de um sistema de produção de ramnolipídeos por biofilme, que adicionalmente proporcione um controle de difusão de nutrientes. Estes experimentos utilizaram minirreatores de ágar (a descrição completa da montagem destes pode ser vista no item 4.5.2.2 dos materiais e métodos).

5.1.2.1 Avaliação da presença de um suporte sólido e do volume do meio de cultivo, que recobre o suporte sólido, sobre a produção de ramnolipídeos

De modo a avaliar o efeito da presença de minirreatores de ágar e do volume do meio de cultivo sobre a produção de ramnolipídeos, foram comparados três processos fermentativos distintos: (1) fermentação submersa [FSb], (2) fermentação semissólida estática, em minirreatores de ágar [(FSSE-MRA) - 5 mL de meio de cultivo] e (3) fermentação semissólida estática, em minirreatores de ágar submersos [(FSSE-MRA-Sub) - 16 mL de meio de cultivo] (Figura 27). Ao comparar os cultivos de FSb e FSSE-MRA, pode-se observar um aumento significativo na produção de ramnolipídeos ao se adicionar MRA ao meio de cultivo (MRA) ($p < 0,0001$), revelando que a presença de um suporte sólido estimula a síntese do metabólito pelo microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*. O efeito positivo da presença de um suporte sólido já foi mostrado em fermentações semissólidas utilizando matrix sólida composta por farinha de colza seca e farelo de trigo (1:1), agitadas a 200 rpm (WU *et al.*, 2017), sendo essa superior, aproximadamente 1,56 vezes, as encontradas na literatura para fermentação submersa (EL-HOUSSEINY *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017).

Em relação ao volume de meio de cultivo, pode se notar que o excesso de meio líquido no processo de FSS-MRA-Sub levou a uma redução na produção de ramnolipídeos em relação ao cultivo de FSS-MRA ($p > 0,0001$), a um valor estatisticamente igual ao obtido por FSb (Figura 27), indicando que uma baixa coluna de meio de cultivo estimula a síntese de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. Esta hipótese pode ser sustentada pelo fato de que altas colunas de líquido dificultam a difusão e conseqüentemente a disponibilidade de oxigênio para o microrganismo em cultivos sem agitação (SIVAPRAKASAM, MAHADEVAN, GOPALARAMAN, 2008), prejudicando assim o desempenho do metabolismo do mesmo (Figura 26). Deste modo, o processo de FSS-MRA mostrou-se como o mais promissor.

Figura 27 - Produção de ramnolipídeos obtida por fermentação submersa, fermentação semissólida estática em minirreatores de cubos de ágar e fermentação semissólida estática, em minirreatores de cubos de ágar submersos.

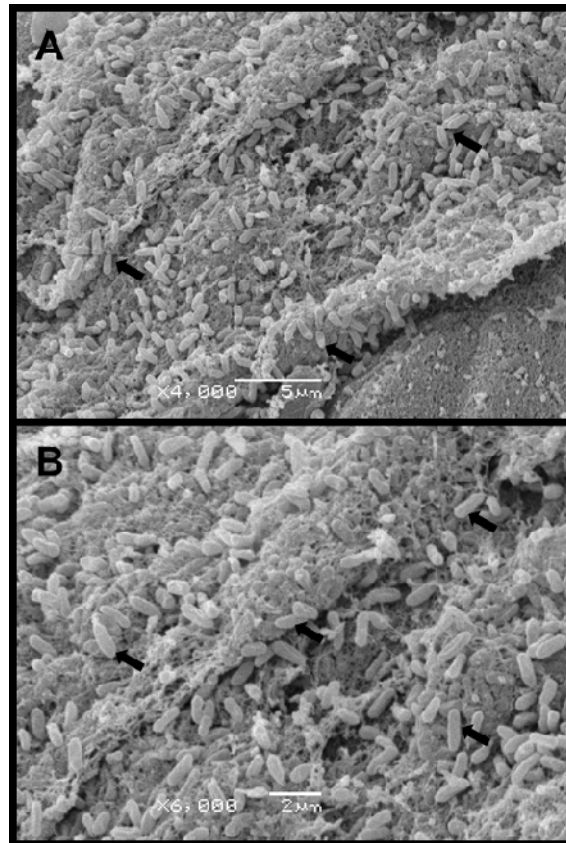


FSb, fermentação submersa; FSS-MRA, fermentação semissólida estática, em minirreatores de ágar; FSSE-MRA-Sub, fermentação semissólida estática, em minirreatores de ágar submersos. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p -valor $<0,001$.

A análise de microscopia eletrônica de varredura do cultivo FSS-MRA aponta para um estabelecimento eficiente do biofilme nos minirreatores de ágar. Este, por sua vez, não aparenta apresentar uma firme aderência ao suporte, o que sugere que o mesmo tenha apenas a função de apoio para o desenvolvimento do biofilme. Diferentemente dos cultivos em suportes sólidos inertes, nos ensaios com

minirreatores de ágar observa-se a formação de dobras na estrutura do biofilme ao invés da formação de colunas (Figura 28).

Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura do cultivo FSS-MRA.



Seta preta: *Pseudomonas aeruginosa*

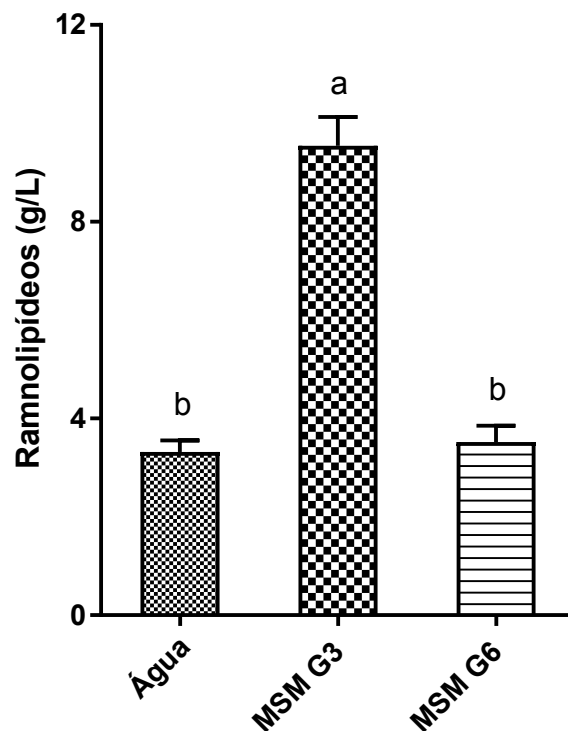
5.1.2.2 Avaliação da composição dos minirreatores de cubos de ágar sobre a produção de ramnolipídeos.

Ensaio de fermentações semissólidas estáticas em minirreatores de cubos de ágar [(FSSE-MRA) com diferentes composições foram realizados para se avaliar o efeito da composição dos MRA sobre a produção de ramnolipídeos por biofilme (Figura 29).

A comparação dos ensaios de FSSE com MRA composto de ágar 1,5 % (m/v) e água (Água) e FSSE com MRA composto por ágar 1,5 % (m/v) + solução de sais + glicerol 3 % (v/v) (MSM G3) revelou que a presença de meio de cultivo, dentro dos minirreatores, levou a um incremento significativo na produção de ramnolipídeos

(Figura 29). Este resultado sugere que o aumento da produção de ramnolipídeos alcançado com a presença do meio de cultivo, dentro dos minirreatores, esteja relacionado com a possível entrega controlada dos nutrientes contidos neste meio. No entanto, o aumento na concentração de glicerol dentro dos MRA para 6 %, por sua vez, propiciou efeito inibitório na produção de ramnolipídeos por este sistema, quando comparado ao ensaio MSM G3.

Figura 29 - Fermentações semissólidas estáticas em minirreatores de cubos de ágar. Avaliação da composição dos reatores.



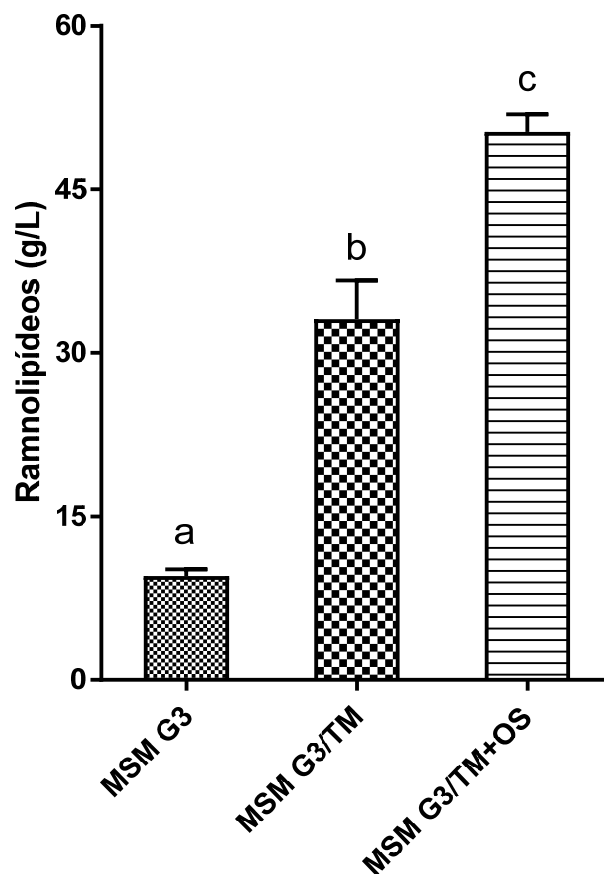
Água, ágar 1,5 % (m/v) em água; MSM G3, ágar 1,5 % (m/v) + solução de sais + glicerol 3 % (v/v); MSM G6, ágar 1,5 % (m/v) + solução de sais + glicerol 6 % (v/v). Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,001.

5.1.2.3 Avaliação da capacidade de entrega controlada de nutriente

Visando analisar a capacidade de entrega controlada de nutrientes dos MRA para o microrganismo, realizaram-se ensaios com adição, ao sistema, de torta de

milho (subproduto sólido da extração de óleo de milho), suplementada ou não com óleo de soja (Figura 30). Um elevado incremento na produção de ramnolipídeos foi obtido tanto com a adição de torta de milho (MSM G3/TM) como com a adição de torta de milho mais óleo de soja (MSM G3/TM+OS), tendo este último alcançado produção superior a 50 g/L. Estes resultados mostraram-se condizentes com os obtidos por Camilios-Neto *et al.* (2011) onde a adição de torta de milho e óleo de soja ao meio de cultivo induziram a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.

Figura 30 - Fermentações semissólidas estáticas em minirreatores de cubos de ágar. Avaliação da adição de agentes indutores da produção de ramnolipídeos, torta de milho (TM) e óleo de soja (OS).



MSM G3, ágar 1,5 % (m/v) + solução de sais + glicerol 3 % (v/v); MSM G3/TM, ágar 1,5 % (m/v) + solução de sais + glicerol 3 % (v/v) + torta de milho 5 %; e MSM G3/TM+OS, ágar 1,5 % (m/v) + solução de sais + glicerol 3% (v/v) + torta de milho 5 % + óleo de soja 1 %. Os

cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,001.

O aumento da produção pela adição de torta de milho aos minirreatores de ágar pode ser justificado pela composição complexa deste resíduo agroindustrial. A torta de milho apresenta em sua composição lipídeos, proteínas, fibras, resíduos minerais e carboidratos; sendo este último encontrado em altas taxas (CAMILIOS-NETO, 2010). Estes nutrientes podem ser consumidos pelo microrganismo, metabolizados pela via de síntese *de novo* de ácidos graxos e pela via de biossíntese da dTDP-L-ramnose, para posteriormente serem convertidos a ramnolipídeos.

Quanto ao incremento na produção pela incorporação de óleo de soja nos minirreatores de ágar, este pode ser justificado pelo alto teor de ácido oleico (21,42 – 23,44 %) e ácido linoleico (52,92 - 56,02 %) (ZAMBIAZI *et al.*, 2007). Estes óleos já foram descritos por estimular a biossíntese de ramnolipídeos, de modo que os maiores rendimentos alcançados para a produção desta biomolécula envolvem cultivos contendo óleos vegetais em sua composição (CAMILIOS-NETO, 2010; GUNSTONE, 1984; JI *et al.*, 2016; ROBERT *et al.*, 1989; SIM *et al.*, 1997; WU *et al.*, 2017).

Apesar do modelo com minirreatores de ágar mostrar-se como um modelo interessante para a produção de ramnolipídeos, este apresenta certas desvantagens para a avaliação do perfil de expressão gênica em biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de ramnolipídeos, como a dificuldade de recuperação da biomassa, utilizada nos ensaios de β -galactosidase, uma vez que esta pode ficar “presa” nos minirreatores de ágar. Além disso a torta de milho pode se desprender dos minirreatores durante o processo de extração aquosa dos ramnolipídeos; de modo que durante o processo de centrifugação do meio para a recuperação da biomassa esta torta sedimenta juntamente a biomassa, atrapalhando a realização do ensaio de β -galactosidase.

A complexidade da composição dos minirreatores de ágar dificulta a análise de expressão gênica, uma vez que identificar possíveis fatores que alteram o perfil de expressão, dos genes de interesse, em meio a tamanha complexidade torna-se algo bem difícil.

5.1.3 Fermentação Submersa Estática de Leito Raso

Os próximos blocos de experimentos tratam do desenvolvimento de um sistema de produção de ramnolipídeos por biofilme formado em processo de fermentação submersa de leito raso.

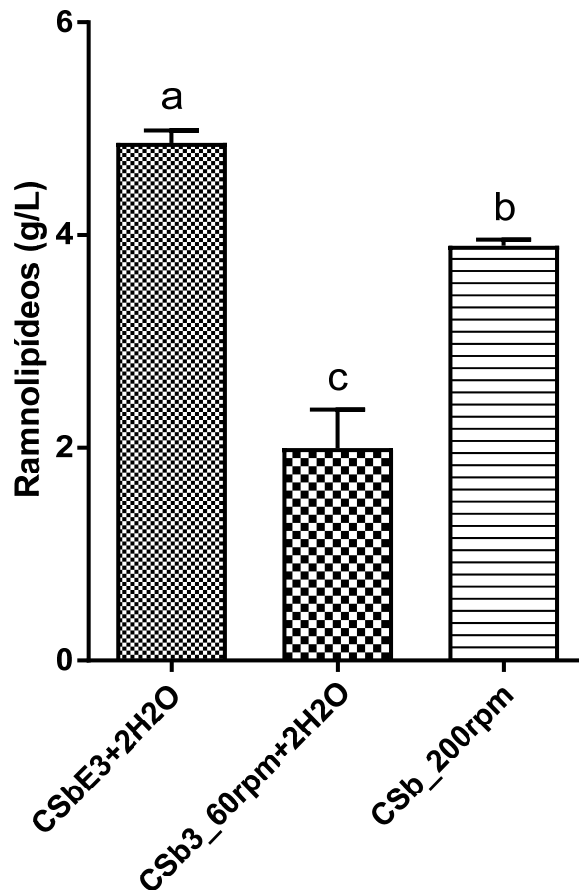
5.1.3.1 Avaliação da produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa de Leito Raso com e sem agitação do cultivo.

Devido à dificuldade de recuperar a biomassa em cultivos onde suportes sólidos são adicionados e a desvantagem acerca de cultivos com meios complexos, surgiu a necessidade do desenvolvimento de um modelo simples para a produção de ramnolipídeos por biofilme. Para isto decidiu-se avaliar a produção do biossurfactante por fermentação submersa de leito raso (frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 3 mL de meio de cultivo), onde o próprio fundo do frasco Erlenmeyer serviria de suporte para o desenvolvimento do biofilme. Note que a adição de água destilada foi necessária nos cultivos de leito raso, uma vez que, estes ressecam durante o período de incubação.

Na figura 31 estão apresentados os resultados referentes a fermentação submersa estática de leito raso com adição de 2 mL de água destilada no 4º dia de cultivo (CSbE3+2H₂O), fermentação submersa de leito raso com agitação de 60 rpm e adição de 2 mL de água destilada no 4º dia de cultivo (CSb3_60rpm+2H₂O) e fermentação submersa clássica (CSb_200 rpm e com relação coluna de ar/meio 1:5).

O cultivo CSbE3+2H₂O apresentou produção de ramnolipídeos significativamente superior à obtida pelos demais métodos fermentativos avaliados. A agitação, mesmo que baixa, desse modelo culminou em um decréscimo na produção do biossurfactantes, alcançando valores inferiores ao observado no cultivo submerso clássico. Esse resultado pode ser devido ao rompimento da estrutura de um possível biofilme formado durante o período de incubação do cultivo, o que desfavoreceu a produção dos ramnolipídeos (CAMILIOS-NETO, 2010).

Figura 31 - Produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa de Leite Raso com e sem agitação do cultivo.



CSbE3+2H2O, fermentação submersa estática de leite raso com adição de 2 mL de água destilada no 4° dia de cultivo; CSb3_60rpm+2H2O, fermentação submersa de leite raso com agitação de 60 rpm e adição de 2 mL de água destilada no 4° dia de cultivo; CSb_200 rpm, fermentação submersa clássica. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,01.

5.1.4 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática em Placas de Cultivo Celular

A ausência de homogeneidade entre o formato dos frascos Erlenmeyer utilizados (diâmetro da boca e formato do fundo) combinada com o pequeno volume de meio (3 mL) dos cultivos dificultaram reprodutibilidade dos experimentos de fermentação submersa de leite raso, o que dificultou uma análise mais precisa do perfil de produção dos ramnolipídeos. O formato do frasco influencia na taxa de secagem do leite ao longo do tempo de cultivo, de modo que os cultivos em frascos com boca larga tendem a secar mais rapidamente do que cultivos em frascos com boca estreita. Essa secagem diferencial tem efeito direto na produção de ramnolipídeos, de modo que, ao final do período de incubação, os cultivos que se mantiveram líquidos apresentavam uma maior produção de ramnolipídeos do que os cultivos que secaram totalmente ou quase totalmente. Adicionalmente, o formato do fundo do frasco também influencia na produção do surfactante. Cultivos em frascos com fundo abaulado aparentemente propiciam uma maior produção de ramnolipídeos do que cultivos em frascos com fundo reto. Deste modo se fez necessário a busca por alternativas que corrigissem os problemas apresentados nesta etapa de desenvolvimento do trabalho.

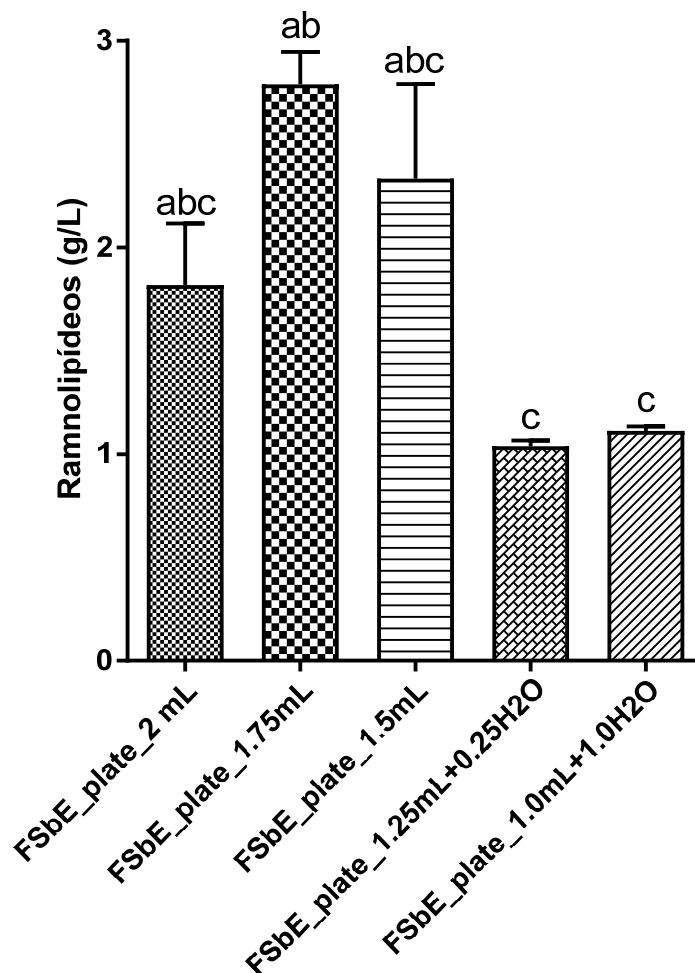
Uma das alternativas avaliadas foi a produção de ramnolipídeos em placas de cultivo celular (Figura 32). Estas placas apresentam poços com tamanho e formato idênticos, o que resolveria em teoria o problema da falta de homogeneidade dos frascos de Erlenmeyer.

Deste modo, foi realizado experimento de avaliação de diferentes volumes de meio adicionados aos poços (Tabela 5, item 4.5.4 dos materiais e métodos), a fim de definir o volume ideal de meio de cultivo para a produção do surfactante. Note que a adição de água destilada foi necessária nos cultivos de com volume inicial de meio de 1,25 mL e 1,0 mL, uma vez que estes ressecam durante o período de incubação. Os resultados referentes aos ensaios com volume inicial de 0,5 mL e 0,75 mL de meio de cultivo não estão apresentados neste trabalho, uma vez que estes secaram totalmente antes do 4º dia de incubação.

Apesar de alguns ensaios apresentarem produções significativamente superiores aos outros, nenhum dos cultivos avaliados alcançou ou superou a produção de 3,9 g/L obtida por fermentação submersa clássica. Tal resultado indica

que possivelmente a coluna de ar do sistema de fermentação é importante para a produção eficiente do biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. Nos cultivos em placa de cultivo celular a coluna de ar é baixa, de modo que a quantidade de oxigênio disponível para o consumo pelo microrganismo é reduzida se comparada com frascos de Erlenmeyer. Essa redução na quantidade de oxigênio disponível muito possivelmente afeta negativamente o desempenho do microrganismo, reduzindo conseqüentemente a biossíntese de ramnolípido.

Figura 32 - Produção de ramnolípídeos por Fermentação Submersa Estática em Placas de Cultivo Celular.



FSbE_plate_2 mL, fermentação submersa estática com volume inicial de meio de 2 mL;
FSbE_plate_1,75 mL, fermentação submersa estática com volume inicial de meio de 1,75

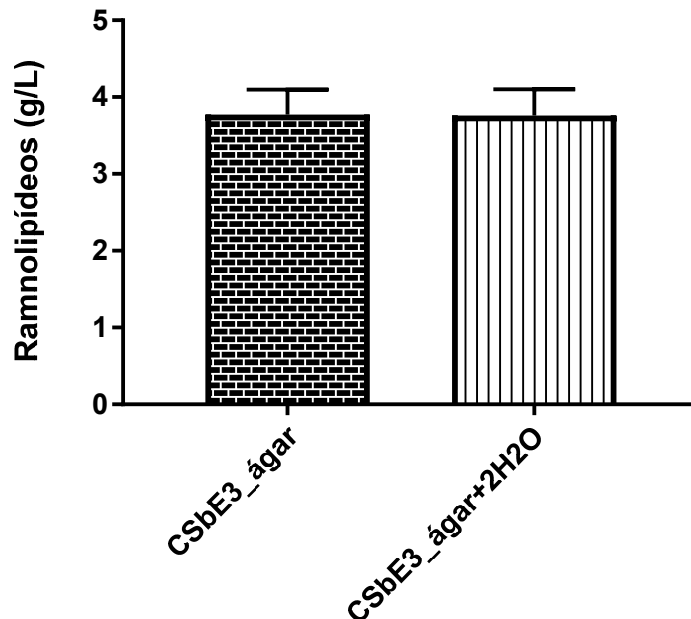
mL; FSbE_plate_1,5 mL, fermentação submersa estática com volume inicial de meio de 1,5 mL; FSbE_plate_1,25 mL+0,25H₂O, fermentação submersa estática com volume inicial de meio de 1,25 mL, com adição de 0,25 mL de água no quarto dia de cultivo; FSbE_plate_1mL+1H₂O, fermentação submersa estática com volume inicial de meio de 1 mL, com adição de 1 mL de água no quarto dia de cultivo. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos duplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,05.

5.1.5 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática de Leito Raso com Membrana de Ágar

Em virtude da importância da coluna de ar para a produção de ramnolipídeos, concluiu-se que o modelo escolhido para avaliar a produção de ramnolipídeo por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* deveria ser desenvolvido em frascos de Erlenmeyer. Deste modo optou-se por investir nos ensaios de fermentação submersa estática de leito raso. Visando corrigir o problema de homogeneidade dos frascos de Erlenmeyer, foram realizados experimentos com frascos de boca estreita contendo no fundo membrana de ágar composta por 5 mL de solução de ágar 2 % (m/v), com a finalidade de eliminar a influência do formato do fundo do frasco sobre a produção do surfactante. Foi avaliado também a influência da adição de água destilada no 4° dia de cultivo sobre esta produção.

A adição de água não apresentou efeito significativo sobre a produção de ramnolipídeos (Figura 33), uma vez que esta tem apenas a função de evitar a secagem do meio até a interrupção do cultivo, e neste caso a presença do ágar já é suficiente para evita o ressecamento completo do cultivo. Além disso, constatou-se que a adição da membrana de ágar nos frascos de Erlenmeyer culminou em um decréscimo na produção, atingindo valores inferiores ao observado na fermentação submersa clássica (comparar Figuras 31 e 33).

Figura 33 - Produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa de Leite Raso com membrana de ágar.



CSbE3_ágar, cultivo submerso estático de leite raso na presença de membrana de ágar 2 %; CSbE3_ágar+2H2O, cultivo submerso estático de leite raso na presença de membrana de ágar 2 % e adição de 2 mL de água destilada no quarto dia de cultivo. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As médias são consideradas estatisticamente idênticas para p-valor $>0,001$. em teste de Tukey.

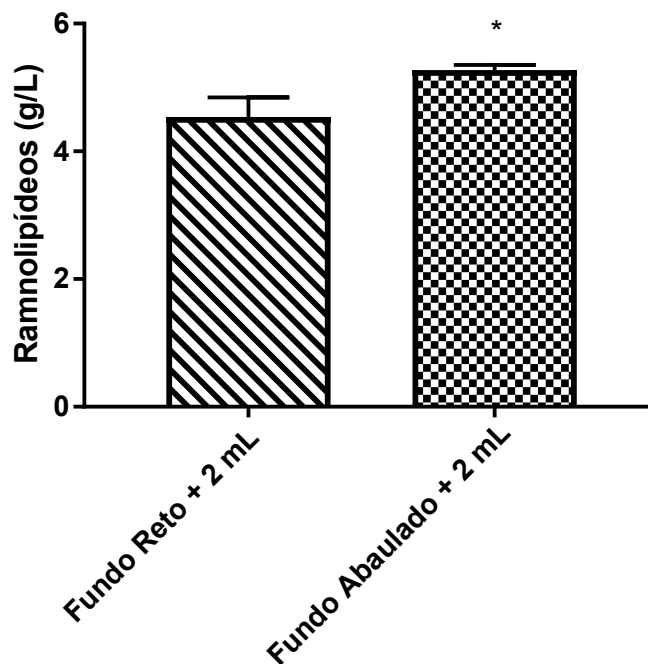
5.1.6 Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Submersa Estática de Leite Raso em Frascos Erlenmeyer de diferentes formatos

5.1.6.1 Avaliação da influência do formato do frasco sobre a produção de ramnolipídeos

Levando em consideração a relevância do formato do fundo dos frascos de Erlenmeyer no modelo de fermentação submersa estática de leite raso, foram avaliadas as produções de ramnolipídeos em frascos de boca estreita e fundo reto e em frascos de boca estreita e fundo abaulado, de modo a se encontrar o formato de frasco ideal para a produção de ramnolipídeos por biofilme.

A utilização do frasco de fundo abaulado propiciou um aumento pequeno, porém significativo, na produção do surfactante (Figura 34). As razões pela qual este formato específico de frasco influencia positivamente a produção de ramnolipídeos é desconhecida, porém acredita-se que possa estar associada a formação de um “gradiente” de altura de leito nesta condição. Nos frascos de fundo abaulado, diferentemente dos frascos de fundo reto, o meio de cultivo distribui-se de modo desigual no fundo do Erlenmeyer, de modo que a maior parte do meio se concentra nas laterais do mesmo. Assim, a porção central do frasco fica recoberta por uma película de meio bem fina, e a espessura desta aumenta gradativamente em direção as laterais do frasco.

Figura 34 - Avaliação da influência do formato do frasco sobre a produção de ramnolipídeos.



Fundo Redondo + 2 mL, fermentação submersa estática de leite raso em erlenmeyer de fundo redondo com adição de 2 mL de água destilada no 4º dia de cultivo; Fundo Abaulado + 2 mL, fermentação submersa estática de leite raso em erlenmeyer de fundo abaulado com adição de 2 mL de água destilada no 4º dia de cultivo. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas ± desvio padrão. As médias são consideradas estatisticamente distintas para p-valor <0,005 em teste de Tukey.

Essa diferença na altura do leito ao longo do fundo do Erlenmeyer culmina em exposições ambientais distintas para as células situadas nas diferentes porções do frasco. Em um primeiro momento as células situadas na região central do Erlenmeyer encontram-se em uma condição ambiental ótima. Com o passar do tempo de incubação dos ensaios, entretanto, devido a secagem do meio de cultivo, estas células ficam expostas a condições estressantes, como baixa disponibilidade de água e nutrientes. Tais condições levariam a uma maior ativação do circuito de *quorum-sensing* nestas células e um desenvolvimento de biofilme, a partir dessas, anterior ao observado na região lateral do fundo do Erlenmeyer. Condições estressantes, tais como baixas taxas de aeração para as células afastadas da superfície do biofilme; dificuldade no acesso aos nutrientes, assim como baixas taxas de crescimento associadas a uma disponibilidade restrita de água foram descritas como capazes de estimular o circuito QS (HENTZER *et al.*, 2003). Estudo realizado por Flickinger *et al.* (2011) demonstraram que o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado inicialmente secretam moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* do tipo HSLs, formando um gradiente de concentração destas moléculas em seu entorno, ativando o circuito de *quorum-sensing* e acelerando o desenvolvimento de biofilme das células encontradas nessa região.

Deste modo, a hipótese do presente trabalho baseia-se em uma possível maior ativação do circuito de *quorum sensing* (QS) nas células do biofilme situadas na região central do frasco de Erlenmeyer, devido as condições estressantes em que estão expostas. Por serem difusíveis, estas moléculas difundiriam em direção as laterais do frasco, ativando o circuito de *quorum-sensing* nas células encontradas nessas regiões. Com o QS ativado e disponibilidade de nutrientes no meio, estes microrganismos são capazes de produzir uma maior quantidade de ramnolipídeos.

Assim, o modelo de fermentação submersa estática em leito raso em Erlenmeyer de fundo abaulado foi definido como o modelo ideal para avaliar o perfil de produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

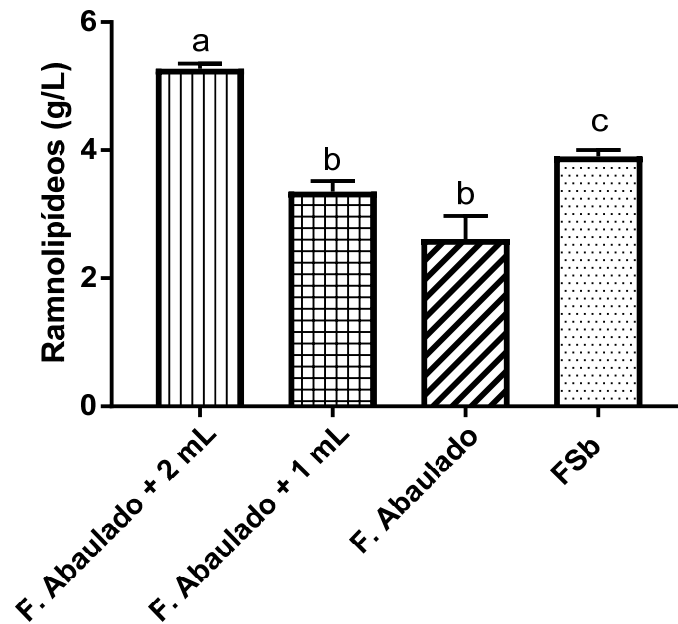
5.1.6.2 Efeito do volume de água adicionado durante o cultivo na produção de ramnolipídeos.

Dado que a adição de água (no quarto dia de cultivo) tem a função de evitar que os cultivos sequem totalmente antes do tempo oportuno de interrupção, o próximo bloco de experimento teve como objetivo avaliar o efeito do volume de água adicionado aos cultivos sobre a produção dos ramnolipídeos (Figura 35).

Os resultados demonstram que não há diferença significativa na produção de ramnolipídeos entre os cultivos submerso estático com adição de 1 mL de água e submerso estático sem adição de água. Ambos, porém apresentam uma menor produção do surfactante em relação ao cultivo submerso.

Os três ensaios (F. Abaulado+1mL, F. Abaulado e FSb) diferem estatisticamente do ensaio de fermentação submersa estática com adição de 2 mL de água, que apresentou uma produção até 1,6 vezes superior ao demais cultivos. Assim, o volume de 2 mL de água destilada foi definido como o volume a ser adicionado no 4º dia de cultivo, uma vez que além de garantir que os cultivos se mantenham líquidos por todo período de incubação foi capaz de incrementar a produção do surfactante.

Figura 35 - Avaliação do efeito do volume de água adicionado durante o cultivo na produção de ramnolipídeos.

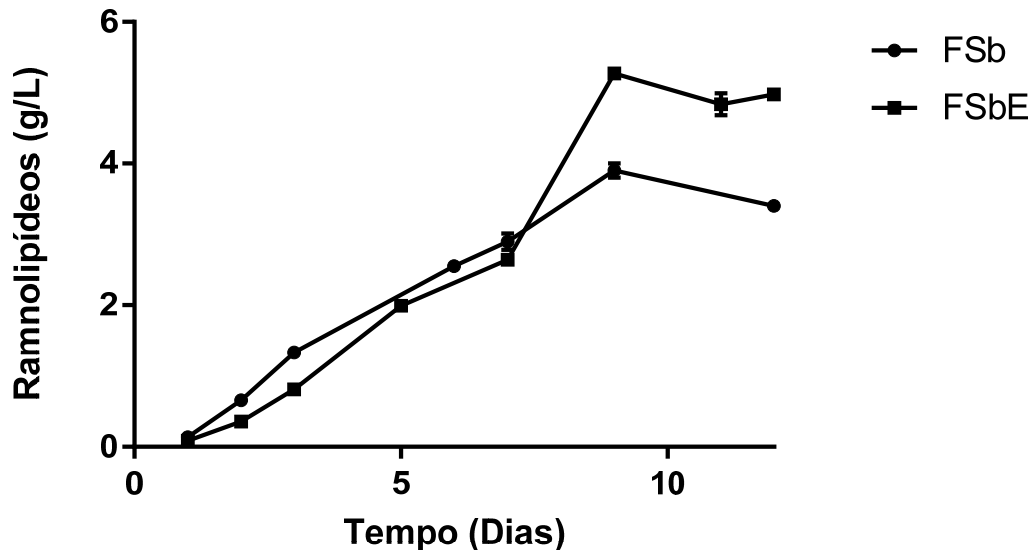


F. Abaulado + 2 mL, fermentação submersa estática de leite raso com adição de 2 mL de água destilada no 4º dia de cultivo; F. Abaulado + 1mL, fermentação submersa estática de leite raso com adição de 1 mL de água destilada no 4º dia de cultivo; F. Abaulado, fermentação submersa estática de leite raso sem adição de água destilada no 4º dia de cultivo; FSb, fermentação submersa. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 9 dias. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,01.

5.2 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E SUBMERSA ESTÁTICA DE LEITO RASO EM ERLENMEYER DE FUNDO ABAULADO

Na figura 36 estão apresentados os resultados comparativos da cinética de produção de ramnolipídeos por fermentação submersa clássica e fermentação submersa estática de leite raso em Erlenmeyer de fundo abaulado. Os cultivos foram avaliados por um período de 12 dias com adição de 2 mL de água destilada no 4º dia de cultivo dos ensaios de fermentação submersa estática de leite raso.

Figura 36 - Cinética de produção de ramnolipídeos por cultivo submerso (FSb) e cultivo submerso estático de leito raso em erlenmeyer de fundo abaulado (FSbE).



Os cultivos foram incubados a 37 °C por 1 a 12 dias com adição de água no 4° dia de cultivo. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão.

O perfil de produção do biossurfactante para ambas as estratégias fermentativas mostra-se similar até o 7° dia de cultivo, tendo os cultivos submersos clássicos uma produção sutilmente superior a observada nos cultivos submersos estáticos. No entanto, entre 7° e o 9° dia de cultivo, os ensaios de fermentação submersa estática apresentaram um aumento de aproximadamente 2,3 vezes na produção do surfactante, seguida de uma pequena queda, porém significativa, a qual se manteve até o final do tempo de cultivo (Figura 36). Os cultivos submersos, por sua vez, tiveram um aumento de 1,34 vezes na produção entre o 7° e o 9° dia de cultivo, seguida de um decréscimo de 1,15 vezes entre o 9° e 12° dia de fermentação (Figura 36).

Deste modo, ao final do período avaliado, a produção do surfactante por cultivo submerso estático foi capaz de superar a obtida por fermentação submersa em 1,46 vezes.

Por meio do estudo de cinética de produção de ramnolipídeos pode-se constatar que o melhor tempo para avaliar este parâmetro é o tempo de 9 dias de cultivo. Neste tempo o cultivo submerso estático atinge a sua maior eficiência, com

uma produção de 5,27 g/L de ramnolipídeos (1,35 vezes superior à observada para o cultivo submerso).

5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CULTIVOS SUBMERSOS E CULTIVOS SUBMERSOS ESTÁTICOS DE LEITO RASO EM ERLENMEYER DE FUNDO ABAULADO POR ENSAIO DE ATIVIDADE DE β – GALACTOSIDASE

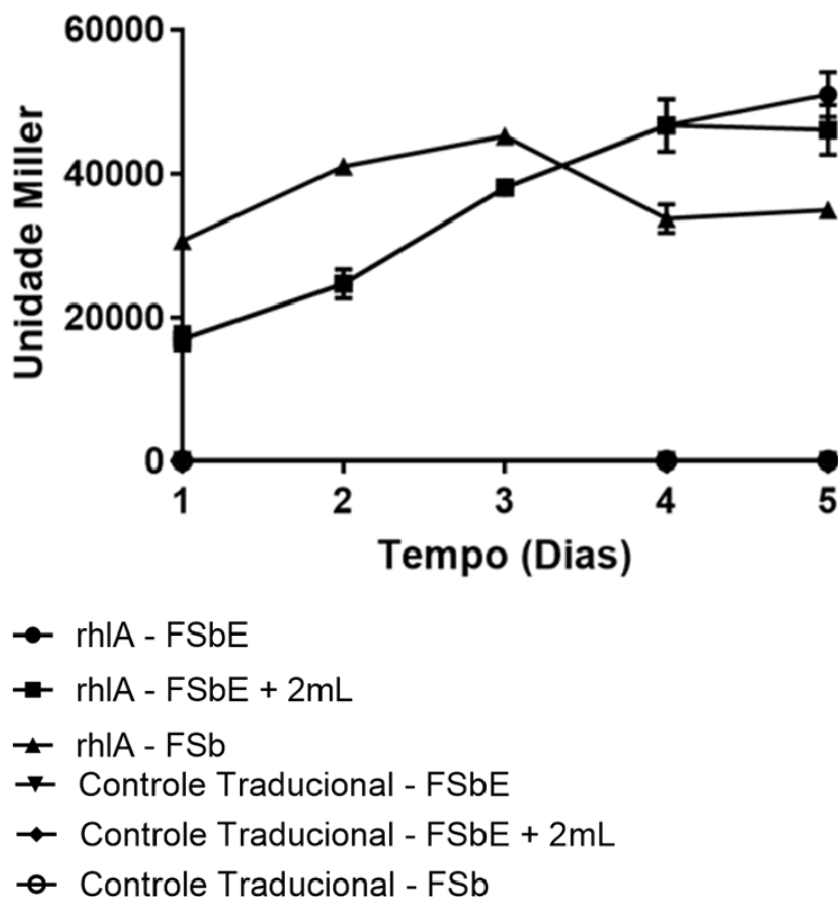
De modo a compreender as mudanças moleculares associadas a produção diferencial de ramnolipídeos entre os ensaios de fermentação submersa e fermentação submersa estática de leito raso em Erlenmeyer de fundo abaulado; foi avaliado o perfil de expressão do gene *rhlA*, responsável pela síntese de uma enzima importante para a biossíntese desse biossurfactante (RhlA), para ambas as estratégias fermentativas (note que *rhlAB* é um operon, portanto as análises de expressão apresentadas neste trabalho dizem respeito a expressão do operon e não apenas *rhlA*). As análises foram realizadas diariamente por um período de cinco dias; com e sem adição de água no quarto dia de cultivo nos ensaios de fermentação submersa estática, objetivando investigar a existência de uma mudança no padrão transcricional neste gene em consequência da adição da água destilada.

A análise da expressão gênica nestes ensaios foi realizada pela avaliação dos perfis de transcrição por fusão traducional, por meio do ensaio de β -galactosidade. Para isto, foi inserido por choque térmico o plasmídeo pECP60, assim como o seu controle traducional pSW205, na cepa selvagem PAO1.

Os resultados referentes a cinética de expressão de *rhlA* nos diferentes ensaios estão apresentados na figura 37. Foi observado que até o terceiro dia de cultivo o nível de expressão do promotor do gene *rhlA* é significativamente superior no cultivo submerso. Entre o terceiro e quarto dia de cultivo uma inversão no perfil de expressão da região promotora pode ser observada, de modo que o nível de expressão no cultivo submerso estático supera a expressão no cultivo submerso em 1,38 vezes.

Esses perfis de expressão se mantem até o quinto dia de cultivo, não havendo alteração significativas nos níveis de expressão da região promotora neste período.

Figura 37 - Análise de expressão gênica em cultivos submersos e cultivos submersos estáticos de leito raso em Erlenmeyer de fundo abaulado por ensaio de atividade de β – galactosidase



Os cultivos foram incubados a 37 °C por 1 a 5 dias com e sem adição de água no 4° dia de cultivo nos ensaios de fermentação submersa estática de leito raso em Erlenmeyer de fundo abaulado. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão.

Tais resultados mostram-se de acordo com os obtidos na avaliação de cinética de produção de ramnolipídeos por estas estratégias fermentativas. A partir do sétimo dia de cultivo pode-se observar que a taxa (ângulo de inclinação da reta) com a qual os ramnolipídeos são produzidos por fermentação submersa mostra-se menor do que a constatada nos cultivos submersos estáticos. Isso pode ser justificado pela mudança no perfil de expressão do gene *rhIA* entre os tempos de 3 e 4 dias de cultivo.

Com o decréscimo da expressão de *rhIA* nos cultivos submersos, a quantidade de enzima RhIA disponível para a biossíntese do biossurfactante também decai, comprometendo a síntese do metabólito. Em contrapartida, o aumento da expressão de *rhIA* nos cultivos submersos estáticos acelera a taxa de produção de ramnolipídeos.

O aumento súbito na produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática entre o sétimo e o nono dia de cultivo pode corresponder com o tempo gasto entre o aumento da expressão do gene e o tempo necessário para que a quantidade ideal de enzima RhIA fosse produzida.

A adição de água no quarto dia de cultivo não causou mudanças significativa no padrão de expressão do promotor no cultivo submerso estático, de modo que aumento de produção do surfactante devido a essa adição de água, observado na Figura 31, deva estar relacionado a manutenção do sistema úmido por todo o período de incubação, e não alteração no perfil de expressão de *rhIA*.

Os resultados de análise do perfil de expressão de *rhIA* sugere que o cultivo por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* tem a capacidade de aumentar a expressão do promotor do gene *rhIA*, que tem o nível máximo de expressão alcançado no quarto dia de cultivo.

6 CONCLUSÃO

6.1 DEFINIÇÃO DE MODELO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa*

Por meio deste trabalho foi possível desenvolver modelos viáveis de produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo estes produção de ramnolipídeos por fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes e fermentação submersa estática de leito raso em Erlenmeyer de fundo abaulado. Esta plataforma fermentativa evita a formação de espuma durante o processo fermentativo, problema recorrente em cultivos submersos, que culmina em uma perda de eficiência do processo. Além disso permite a utilização de resíduos agroindustriais como suporte para o desenvolvimento do biofilme.

- Produção de Ramnolipídeos por Fermentação Semissólida Estática em Sistema de Difusão Controlada de Nutrientes: Apesar desse modelo ser inviável para a análise de expressão genica, este apresentou resultados interessantes quanto a produção do surfactante. Nesta bateria de experimento constatou-se que uma baixa coluna de meio de cultivo estimula a síntese de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. A adição de meio de cultivo na composição dos minirreatores de ágar aumentou a produção do surfactante, por um processo de entrega controlada dos nutrientes contidos neste meio. Por meio da inserção de torta de milho e óleo de soja nos minirreatores de ágar foi possível alcançar uma produção de 50,26 g/L.
- Fermentação Submersa Estática de Leito Raso em Erlenmeyer de Fundo Abaulado: Esta estratégia fermentativa mostrou-se adequada tanto para a produção do surfactante quanto para a análise da expressão genica, sendo então o modelo de escolha para as análises subsequentes. Nesta bateria de experimentos observou-se que a adição de 2 mL de água no quarto dia de cultivo estimula a produção do surfactante. Este modelo fermentativo

apresenta eficiência máxima em nove dias de cultivo, alcançando produção de 5,27 g/L.

6.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CULTIVOS SUBMERSOS E CULTIVOS SUBMERSOS ESTÁTICOS DE LEITO RASO EM ERLLENMEYER DE FUNDO ABAULADO POR ENSAIO DE ATIVIDADE DE β – GALACTOSIDASE

- Esta análise objetivou compreender as mudanças moleculares associadas a produção diferencial de ramnolipídeos entre os ensaios de fermentação submersa e fermentação submersa estática de leite raso em Erlenmeyer de fundo abaulado, através da avaliação do perfil de expressão do gene *rhIA* para ambas as estratégias fermentativas;
- Os resultados desta bateria de experimentos revelaram um aumento significativo do nível de expressão do promotor do gene *rhIA* no cultivo submerso estático entre o terceiro e quarto dia de cultivo, levando a uma inversão no perfil de expressão da região promotora avaliada;
- O perfil transcricional mostrou-se coerente com os resultados de cinética de produção;
- A adição de água no quarto dia de cultivo não causou mudanças no padrão de expressão do promotor no cultivo submerso estático, indicando que o aumento de produção do surfactante devido a essa adição de água deva estar relacionado a manutenção da umidade do meio até o fim do experimento;
- Os resultados de análise do perfil de expressão de *rhIA* revelaram que o cultivo por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* tem a capacidade de aumentar a expressão do promotor do gene *rhIA*.

7 EXPERIMENTOS FUTUROS

1. Análise da expressão dos genes *rhII*, *lasI* e *pqsA*, por ensaio de β -galactosidade, em cultivos submersos e cultivos submersos estáticos de leite raso em Erlenmeyer de fundo abaulado;
2. Caracterização dos ramnolipídeos produzidos por fermentação submersa e fermentação submersa estática de leite raso em frascos Erlenmeyer: avaliação dos congêneres, índice de emulsificação, tensão superficial e concentração micelar crítica;
3. Análise qualitativa e quantitativa das moléculas sinalizadoras do QS (ACIL-HSLs e PQS) produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*;
4. Avaliação da formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* transformada com plasmídeo que expressa proteína fluorescente verde (GFP) nos ensaios de fermentação submersa estática de leite raso por microscopia de fluorescência e por microscopia confocal.

REFERENCIAS

- 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.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MÜLLER, M. M.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. **Microbiology Monographs**, v. 20, p. 13-55, 2011.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LEPINE F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins, and roles. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p. 1323–1336, 2010.
- AGUIRRE-RAMÍREZ, M.; MEDINA, G.; GONZÁLEZ-VALDEZ, A.; GROSSO-BECERRA, V.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor σ^S . **Microbiology**, v. 158, p. 908-916, 2012.
- ANDRÁ, J.; RADEMANN, J.; HOWE, J.; KOCH, M. H. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: Immune cell stimulation and biophysical characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 387, p. 301–310, 2006.
- BAFGHI, K.; FAZAELIPOOR, M. H. Application of Rhamnolipid in the Formulation of a Detergent Mansureh. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 15, p. 679-684, 2012.
- BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53 (5), p. 495–508, 2000.

BAPTISTA, S. J. **Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel**. 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BAZIRE, A.; DUFOUR, A. The *Pseudomonas aeruginosa* rhIG and rhIAB genes are inversely regulated and RhIG is not required for rhamnolipid synthesis. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 1-9, 2014.

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. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1–8, 2004.

BERGSTROM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. Pyolipic acid. A metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea* active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 10, p.165–166, 1946.

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

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Sci Total Environ**, v. 407, p. 3634-3640, 2009.

CAMILIOS-NETO, D. **Produção de Rhamnolipídeos por Fermentação em Estado Sólido**. 2010. Tese (Doutorado Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CAMILIOS-NETO, D.; BUGAY, C.; SANTANA-FILHO, A. P.; JOSLIN, T.; SOUZA, L.M.; SASSAKI, G.L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran

supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1395-1403, 2011.

CAMILIOS-NETO, D.; MEIRA, J.A.; TIBURTIUS, E.; ZAMORA, P.P.; BUGAY, C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 748-755, 2009.

CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A.D., NAJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERON-CHAVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhIG gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4442-4451, 1998.

CAO, H.; KRISHNAN, G.; GOUMNEROV, B.; TSONGALIS, J.; TOMPKINS, R.; RAHME, L. G. A quorum sensing- associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14613–14618, 2001.

CAYMAN CHEMICAL. **N-butiril-HSL**. Disponível em:

<<https://www.caymanchem.com/product/10007898>>. Acesso em: 22 jul.2016.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, K. L. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, 2001.

CHUA, S. L.; LIU, Y.; LI, Y.; TING, H. J.; KOHLI, G. S.; CAI, Z.; SUWANCHAIKASEM, P.; GOH, K. K. K.; NG, S. P.; TOLKER-NIELSEN, T.; YANG, L.; GIVSKOV, M. Reduced Intracellular c-di-GMP Content Increases Expression of Quorum Sensing-Regulated Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-8, 2017.

CRODA-GARCÍA, G.; GROSSO-BECERRA, V.; GONZALEZ-VALDEZ, A.; SERVÍN-GONZÁLEZ, L.; SOBERÓN- CHÁVEZ, G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhIR: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor

regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. **Microbiology**, v. 157, p. 2545–2555, 2011.

DAS, P.; YANG, X. P.; MA, L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-8, 2014.

DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; TOOTLE, G. A. O. Rhamnolipid surfactant production affects biofilms architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PA-01. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 1027–1036, 2003.

DEEPIKA, K. V.; SRIDHAR, P. R.; BRAMHACHARI, P. V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 1-8, 2015.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 523-529, 2004.

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

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, 1997.

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

DIGGLE, S.P., CORNELIS, P., WILLIAMS, P., CAMARA, M. 2006. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Old molecules, new perspectives. **International Journal of Medical Microbiology**, 296(2-3), 83-91.

DUBEAU, D.; DÉZIEL, E.; WOODS, D.; LÉPINE, F. Burkholderia thailandensis harbours two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 263, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K ; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956

EDWARDS, J. R.; HAYASHI, J. A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 111, p. 415–421, 1965.

EL-HOUSSEINY, G. S.; ABOULWAFI, M. M.; ABOSHANAB, K. A.; HASSOUNA, N. A. H. Optimization of Rhamnolipid Production by *P. aeruginosa* Isolate P6. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 19, p. 943-955, 2016.

FLICKINGER, S. T.; COPELAND, M. F.; DOWNES, E. M.; T. BRAASCH, A. T.; TUSON, H. H.; EUN, Y. J.; WEIBEL, D. B. Quorum Sensing between *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Accelerates Cell Growth. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 5966-5975, 2011.

GALGANO, P. D. **Líquidos Iônicos Tensoativos: Correlação entre Estrutura Molecular e Propriedades Micelares de Cloretos de 1,3-dialquilimidazólio**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GALLAGHER, L. A.; MCKNIGHT, S. L.; KUZNETSOVA, M.S.; PESCI, E.C.; MANOIL, C. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6472–6480, 2002.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 158, p. 694–705, 2009.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Biosurfactants Market worth over \$2.7 bn by 2024**. Disponível em : <<https://www.gminsights.com/pressrelease/biosurfactants-market-size>>. Acesso em: 14 mar.2018.

GODDARD, E. Surfactants and interfacial phenomena. **Colloids and Surfaces**, v.40, p. 347, 1989.

GRIFFIN, W. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 5, p. 235–249, 1954.

GROSSO-BECERRA, M. V.; GONZALEZ-VALDEZ, A.; GRANADOS-MARTÍNEZ, M.J.; MORALES, E.; SERVÍN-GONZÁLES, L.; MÉNDEZ, J.L.; DELGADO, G.; MORALES-ESPINOSA, R.; PONCE-SOTO, G. Y.; COCOTL-YANEZ, M.; SOBERO-CHÁVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 9995–10004, 2016.

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

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

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87-93, 2015.

GUNSTONE, F.D. Reaction of Oxygen and Unsaturated Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, p. 441–447, 1984.

HAUSER, G.; KARNOVSKY, M. L. Studies on the production of glycolipide by Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Bacteriology**, v. 68, p. 645–654, 1954.

HAÜSSLER, S.; NIMTZ, M.; DOMKE, T.; WRAY, V.; STEINMETZ, I. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1588–1593, 1998.

HAÜSSLER, S.; RHODE, M.; VON NEUHOFF, N.; NIMTZ, M.; STEINMETZ, I. Structural and functional changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2970–2975, 2003.

HE, C.; DONG, W.; LI, J; LI, Y.; HUANG, C.; MA, Y. Characterization of rhamnolipid biosurfactants produced by recombinant *Pseudomonas aeruginosa* strain DAB with removal of crude oil. **Biotechnology Letters**, v. 39, p. 1381-1388, 2017.

HENTZER, M.; WU, H.; ANDERSEN, J.B.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T. B.; BAGGE, N.; KUMAR, N.; SCHEMBRI, M.A.; SONG, Z.; KRISTOFFERSEN, P.; MANEFIELD, M.; COSTERTON, J.W.; MOLIN, S.; EBERL, L.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; HÜIBY, N.; GIVSKOV, M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **The EMBO Journal**, v 22, p.3803-3815, 2003.

HIRAYAMA, T.; KATO, I. Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Letters**, v. 139, p. 81–85, 1982.

HOLLOWAY, B. W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa* **Journal of General Microbiology**, v. 13, p. 572-581, 1955.

HOLMBERG, K. Natural Surfactants Current Opinion in **Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 148-159, 2001.

HORI, K.; ICHINOHE, R.; UNNO, H.; MARSUDI, S. Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 196-202, 2011.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on n-Paraffin. **The Journal of Antibiotics**. 24, p.855–859, 1971.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 4124–4126, 1949.

JI, F.; LI, L.; MA, S.; WANG, J.; BAO, Y. Production of rhamnolipids with a high specificity by *Pseudomonas aeruginosa* M408 isolated from petroleum-contaminated soil using olive oil as sole carbon source. **AnnMicrobiol**, v. 66, p. 1145-1156, 2016.

JOY, S.; BUTALIA, T.; SHARMA, S.; RAHMAN, P. K. S. M. **Biosurfactant Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Environment**. 2017.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell. Biol.** v. 27, p. 137-138, 1965.

KASKATEPE, B.; YILDIZ, S. Rhamnolipid Biosurfactants Produced by *Pseudomonas Species*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-16, 2016.

KRIEGER, N; CAMILIOS NETO, D; MITCHELL DA. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: Ramkrishna Sen. (Org.). *Advances in Experimental Medicine and Biology. Biosurfactants*. New York: Springer Science+Business media, LCC, Landes Bioscience, v. 672, p. 203-209, 2010.

KRONEMBERGER, F. A. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. (2007). Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LAMARCHE, M. G.; DÉZIEL, E. MexEF-oprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 22–32, 1999.

LEE, B. S.; KIM, E. K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639–647, 2004.

LEE, K.M.; HWANG, S.H.; HA, S.D.; JANG, J.H.; LIM, D.J.; KONG, J.Y.
Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, p. 267-273, 2004.

LIMA, C.J.B.; RIBEIRO, E.J.; SÉRVULO, E.F.C.; RESENDE, M.M.; CARDOSO, V.L.
Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 152, p. 156-168, 2009.

LINHARDT, R. J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W.
Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 365–368, 1989.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J.
Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 1715-1726, 2015.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v. 29, p. 138–142, 2013.

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

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA. S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675–683, 2005.

MANEERAT, S.; SONGKLANAKARIN J. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **SciTechnol**, v. 27, 2005.

MAURA, D.; HAZAN, R.; KITAO, T.; BALLOK, A. E.; RAHME, L. G. Evidence for Direct Control of Virulence and Defense Gene Circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator, MvfR. **Nature Publishing Group**, p. 1-14, 2016.

MCGRATH, S.; WADE, D. S.; PESCI, E. C. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 27–34, 2004.

MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; VALDERRAMA, B.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR Transcriptional regulation of the rhlAB promoter **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 5976-5983, 2003.

MILLER, J. H. A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1992.

MOUSSA, T. A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 867-880, 2014.

MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids – Next generation surfactants?. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 366-380, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, DIVISION ON ENGINEERING AND PHYSICAL SCIENCES, COMMISSION ON ENGINEERING AND TECHNICAL SYSTEMS, COMMITTEE ON IN SITU BIOREMEDIATION. **In Situ Bioremediation: When Does It Work?**. 1. ed. Routledge, 1993. 224p.

NAYAK, A. S.; VIJAYKUMAR, M. H.; KAREGOUDAR, T. B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp.PNK-04 and its application in biore- mediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 73–79, 2009.

NGUYEN, T. T.; SABATINI, D. A. Formulating alcohol-free microemulsions using rhamnolipid biosurfactant and rhamnolipid mixtures. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 12, p. 109–115, 2009.

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

O'LOUGHLIN, C. T.; MILLER, L. C.; SIRYAPORN, A.; DRESCHERA, K.; SEMMELHACKB, M. F.; BASSLER, B. L. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 17981-17986, 2013.

OCHSNER, U.A.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 19787-19795, 1994.

OCHSNER, U.A.; REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 92, p. 6424-6428, 1995.

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

PALANISAMY P.; RAICHUR A. M. Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 199–204 2009.

PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 2531-2539, 2007.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signalresponse systems in gram-negative bacteria. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 14, p. 576-588, 2016.

PARRY, A. J.; PARRY, N. J.; PEILOW, C.; STEVENSON, P. S. Combinations of Rhamnolipids and Enzymes for Improved Cleaning. Patent no. EP 2596087 A1, 2013.

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

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Surface-active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3. **Journal of Basic Microbiology**, v. 37, p. 281–286, 1997b.

PEARSON, J. P.; PESCI, E. C.; IGLEWSKI, B. H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. **Journal of bacteriology**, v. 179, p. 5756-5767, 1997.

PHILLIPS, T. Bioremediation: Using living organisms to clean the environment. How you can help environment with bioremediation practices. Disponível em: <<https://www.thebalance.com/cleaning-the-environment-through-bioremediation-375586>>. Acesso em: 14 mar.2018.

PILJAC, T.; PILJAC, G. Use of Rhamnolipids as Cosmetics. Patent no. **EP 1056462 B1**, 2007.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Planra daninha*, v. 21, p. 335-341, 2003.

PUSTELNY, C., ALBERS, A., BUELDT-KARENTZOPOULOS, K., PARSCHAT, K., CHHABRA, S.R., CAMARA, M., WILLIAMS, P., FETZNER, S. 2009. Dioxygenase-Mediated Quenching of Quinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemical & Biology**, 16(12), 1259-1267.

PUSTELNY, C.; ALBERTS, A.; BÜLDT-KARENTZOPOULOS, K.; PARSCHAT, K.; CHHABRA, S. R.; CAMARA, M.; et al. Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Chem Biol**, v. 16, p. 1259-1267, 2009.

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

RAICHUR, A. M. Dispersion of colloidal alumina using a rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, p. 1272–1277, 2007.

RAMPIONI, G.; FALCONE, M.; HEEB, S.; FRANGIPANI, E.; FLETCHER, M. P.; DUBERN, J. F.; VISCA, P.; LEONI, L.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLOS Pathogens**, p. 1-25, 2016.

RAMPIONI, G.; PUSTELNY, C.; FLETCHER, M. P.; WRIGHT, W. J.; BRUCE, M.; RUMBAUGH, K. P.; HEEB, S.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P. Transcriptomic analysis

reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 1659-1673, 2010.

RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants – past, presente, and future scenario of global Market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2014.

RASAMIRAVAKA, T.; VANDEPUTTE, O. M.; POTTIER, L.; HUET, J.; RABEMANANTSOA, C.; KIENDREBEOGO, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RASAMINDRAKOTROKA, A.; STÉVIGNY, C.; DUEZ, P.; EL-JAZIRI, M. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Persistence , along with the Production of Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors , are Disrupted by a Triterpenoid Coumarate Ester Isolated from *Dalbergia trichocarpa* , a Tropical Legume. **PLOS One**, p. 1-32, 2015.

REDDY, K. S.; KHAN, M. Y.; ARCHANA, K.; REDDY, M. G.; HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 toward its application as biocontrol agente. **Bioresour. Technol**, v. 221, p. 291-299, 2016.

REIS, R.S., PEREIRA, A.G., NEVES, B.C., FREIRE, D.M. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6377-84, 2011.

RIKALOVIC, M. G; GOJGIC-CVIJOVIC, G.; VRVIC, M. M; KARADZIC, I. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, p. 27-42, 2012.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* aeruginosa 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 871–874, 1989.

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

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1005–1016, 2012.

SCHUSTER, M.; LOSTROH, C.P; OGI, T.; GREENBERG, E.P. Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: a Transcriptome Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2066-2079, 2003.

SHAHA, M. U. H.; SIVAPRAGASAMB, M.; MONIRUZZAMANA, M.; YUSUPA, S. B. A comparison of recovery methods of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Procedia Engineering**, v. 148, p. 494-500, 2016.

SIGMA ALDRICH. **N-(3-oxododecanoil)-HSL**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/94398?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 22 jul.2016.

SIGMA ALDRICH. **Quinolona (2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o9139?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 22 jul.2016.

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

SIM, L.; WARD, O.P.; LI, Z-Y. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 232-238, 1997.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, 2007.

SIVAPRAKASAM, S.; MAHADEVAN, S.; GOPALARAMAN, S. Oxygen mass transfer studies on batch cultivation of *P. aeruginosa* in a biocalorimeter. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, 2008.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SOTIROVA, A.; SPASOVA, D.; VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, D. Effects of rhamnolipid biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Res.**, v. 164, p. 297–303, 2009.

SPONZA, D.T.; GOK, O. Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101 (3), p. 914–924, 2010.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S.; OLSON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 409, p. 959-964, 2000.

STOVER, C. K.; PHAM, X.Q.; ERWIN, A.L.; MIZOGUCHI, S.D.; WARRENER, P. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.

SYLDATK, C., WAGNER, F. Production of biosurfactants. **Biosurfactants and Biotechnology**, v. 25, p. 89–120, 1987.

TERZIYSKIA, I.; ALEXANDROVAA, L.; STOINEVAB, I.; CHRISTOVAC, N.; TODOROVA, R.; COHEN, R. Foam and wetting films from rhamnolipids produced by

Pseudomonas aeruginosa BN10. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 460, p. 299-305, 2014.

THOMPSON, L. S.; WEBB, J. S.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene rhII in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 187-195, 2003.

TORIBIO, J.; ESCALANTE, A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 1082-1087, 2010.

TRIPATHY, S. S.; RAICHUR, A. M. Dispersibility of barium titanate suspension in the presence of polyelectrolytes: a review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, p. 230–239, 2008.

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

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

TURNER, K. H.; WESSEL, A. K.; PALMER, G. C.; MURRAY, J. L.; WHITELEY, M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, p. 4110-4115, 2015.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. **Biotechnol. Adv.** V. 24, 2006.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes.

International Journal of Molecular Sciences, v. 11, p. 5095-5108, 2010.

WADEKAR S, D.; KALE, S. B.; LALI, A. M.; BHOWMICK, D. N; PRATAP, A. P. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 42, p. 249-266, 2012.

WAGNER, V.E.; BUSHNELL, D.; PASSADOR, L.; BROOKS, A.I.; IGLEWSKI, B.H. Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p.2080-2095, 2003.

WEI, Y.H.; CHOU, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petroChem. **Wastewater Biochemical Engineering Journal**, v. 27, 2005.

WIGNESWARAN, V.; NIELSEN, K. F.; STERNBERG, C.; JENSEN, P. R.; FOLKESSON, A.; JELSBÄK, L. Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440. **Microb Cell Fact**, v. 15, p. 1-13, 2016.

WILLIAMS, J. J. Formulation of Carpet Cleaners. **Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces**, v. 1, p. 103-123, 2007.

WITTEGINS, A.; KOVACIC, F.; MÜLLER, M. M.; GERLITZKI, M.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; HOFMANN, D.; TISO, T.; BLANK, L. M.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R.; SYLDATK, C.; WILHELM, S.; ROSENAU, F. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, p. 2865-2878, 2017.

WU, J.; ZHANG, J.; WANG, P.; ZHU, L.; GAO, M.; ZHENG, Z.; ZHAN, X. Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, p. 1611–1619, 2017.

XIE, Y. W.; YE, R. Q.; LIU, H. L. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 279, p. 175–178, 2006.

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

YORK, J. D.; FIROOZABADI, A. Comparing effectiveness of rhamnolipid biosurfactant with a quaternary ammonium salt surfactant for hydrate anti-agglomeration. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 845–851, 2008.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **B.CEPPA, Curitiba**, v. 25, p. 111-120, 2007.

ZHANG, Y. M.; MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). **Applied and Environment Microbiology**, v. 58, p. 3276–3282, 1992.

ZHAO, F.; ZHOU, J.; HAN, S.; MA, F.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. Medium factors on anaerobic production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* SG and a simplifying medium for in situ microbial enhanced oil recovery applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-11. 2016.

ZHENG, Y.; ZHENG, M.; MA, Z.; XIN, B.; GUO, R.; XU, X. Sugar Fatty Acid Esters. **Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology**, p. 215-243, 2015.

ZHU, K.; ROCK, C.O. RhIA Converts β -Hydroxyacyl-Acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 3147-3154, 2008.

ZHU, L.; YANG, X.; XUE, C.; CHEN, Y.; QU, L.; LU, W. Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 208-213, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1 – Tabela com dados de produção de ramnolipídeos.

Tabela 7 – Produções de ramnolipídeos obtidas por diferentes estratégias fermentativas avaliadas neste trabalho.

Estratégias Fermentativas	Produção (g/L)
FSb200rpm / FSb / CSb_200rpm	3,9±0,1
FSb_60rpm / FSb60rpm	0,87±0,06
FSb_60rpm_Algodão	1,63±0,11
FSb_60rpm_Lã de Vidro	1,47±0,06
FSb_60rpm_Gaze / FSb60rpm_Gaze	2,33±0,11
FSbE_Gaze	2,27±0,06
FSb200rpm_Gaze	4,03±0,23
FSSE_MRA / MSM G3	9,54±1,56
FSSE_MRA_Sub	3,2±0,63
Água	3,32±0,47
MSM G6	3,52±0,74
MSM G3/TM	33,09±6,17
MSM G3/TM + OS	50,26±2,87
CSbE3+2H2O	4,87±1,67
CSb3_60rpm+2H2O	1,99±0,63
FSbE_plate_2mL	1,82±0,52
FSbE_plate_1,75mL	2,79±0,22
FSbE_plate_1,5mL	2,33±0,65
FSbE_plate_1,25mL+0,25H2O	1,04±0,038
FSbE_plate_1mL+1H2O	1,11±0,032
CSbE3_ágar	3,77±0,32
CSbE3_ágar+2H2O	3,76±0,34
Fundo Reto+2mL	4,54±0,31
Fundo Abaulado+2mL / F. Abaulado+2mL	5,27±0,08
F. Abaulado+1mL	3,35±0,17

F. Abaulado

2,6±0,36

ANEXO 2 – Patente: Produção de Ramnolipídeos por fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes.

VIGNOLI, J. A.; CAMILIOS-NETO, D.; ALMEIDA, M. A.; CONCEICAO, K. S.; SAWONIUK, I. C.; MATIUSSO, M. M. **Produção de ramnolipídeos por fermentação semissólida estática em sistema de difusão controlada de nutrientes**, 2017. Patente de Invenção. Número do registro: BR1020170207897. Data de depósito: 28/09/2017.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 020789 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS
UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br