



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAREN STEFANY CONCEIÇÃO

**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CULTIVOS
SUBMERSOS ESTÁTICOS EM SUPORTE DE MEMBRANAS
DE CELULOSE BACTERIANA**

Londrina
2018

KAREN STEFANY CONCEIÇÃO

**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CULTIVOS
SUBMERSOS ESTÁTICOS EM SUPORTE DE MEMBRANAS
DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto

Coorientadora: Profa. Dra. Josiane A. Vignoli

Londrina
2018

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

Conceição, Karen Stefany.

Produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana / Karen Stefany Conceição. - Londrina, 2018. 96 f. : il.

Orientador: Doumit Camilios Neto.

Coorientador: Josiane Alessandra Vignoli.

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

Inclui bibliografia.

1. Biossurfactantes - Tese. 2. Pseudomonas aeruginosa - Tese. 3. Ramnolipídeos Tese. 4. Membrana de celulose bacteriana - Tese. I. Camilios Neto, Doumit. II. Vignoli, Josiane Alessandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

KAREN STEFANY CONCEIÇÃO

**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CULTIVOS
SUBMERSOS ESTÁTICOS EM SUPORTE DE MEMBRANAS
DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de Fevereiro de 2018.

A dúvida é o principio da sabedoria.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me ajudar a vencer obstáculos.

Aos meus pais por acreditar, incentivar e sempre apoiar meus estudos.

Agradeço aos Professores Dr. Doumit Camillos Neto e Dra. Josiane Alessandra Vignoli por todas as orientações, incentivo, paciência, amizade e pela contribuição para realização deste trabalho, assim como de minha formação.

Ao Professor Dr. Cesar Augusto Tischer por ter gentilmente cedido as Membranas de Celulose Bacteriana utilizadas.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Cesar Augusto Tischer e Dra. Wilma Aparecida Spinosa pela disponibilidade em participar deste momento e ajudarem na melhora do presente trabalho.

Aos meus queridos amigos e participantes do nosso grupo de pesquisa que sempre estavam presentes.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, CAPES e a todos os docentes e funcionários, por contribuírem para meu desenvolvimento acadêmico.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

CONCEIÇÃO, Karen Stefany. **Produção de ramnolípídeos por cultivos submersos estáticos em suporte de membrana de celulose bacteriana**. 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Os ramnolípídeos são surfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, que tendem a se distribuir nas interfaces óleo/água e água/óleo. Essas biomoléculas têm grande potencial de mercado por apresentarem baixa toxicidade, alta compatibilidade ambiental e serem biodegradáveis. Entretanto a aplicação destes compostos ainda é limitada devido aos altos custos de produção quando comparados aos surfactantes de origem química. O cultivo submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana (CSbE-MBC) é um processo alternativo de produção de ramnolípídeos que evita a formação de espuma, característica da produção de biosurfactantes por fermentação submersa clássica. A formação de espuma é um grave problema, pois acarreta em perda de biomassa e nutrientes, diminuindo os índices de produção ou até mesmo inviabilizando o processo. Outra vantagem do CSbE-MBC é o baixo custo operacional, pois as membranas são reutilizáveis e o processo é estático, não havendo necessidade de gastos adicionais com energia para aeração e agitação. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um processo de produção de ramnolípídeos por CSbE-MBC, determinar a mistura de congêneres obtida, assim como as propriedades físico-químicas. Adicionalmente, foram avaliadas uma série de estratégias de incremento de produção de ramnolípídeos obtidos por esta tecnologia fermentativa. A composição da mistura de ramnolípídeos produzida por esta tecnologia fermentativa apresentou maior porcentagem de di-ramnolípídeos (95%), sendo o congêneres Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ o mais abundante (66%), a obtenção de uma molécula única é requerida para aplicações mais refinadas como, o uso como potencial medicamento. A CMC determinada foi de 42,3 mg/L, em linhas gerais a mistura de ramnolípídeos obtidas no presente processo apresentou uma CMC que se enquadra entre os melhores resultados para ramnolípídeos encontrados na literatura científica. A mistura apresentou um elevado poder emulsificante, mostrando maior poder emulsificante para querosene, superior a 80%. Os CSbE-MCB de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 utilizando 1 membrana de celulose bacteriana umedecida com 3 mL de meio de cultivo, adicionados de extrato aquoso de torta de milho 1:1 e 6%, v/v de glicerol, incubados sem agitação por 9 dias alcançaram 15,34 g/L de ramnolípídeos extraídos e recuperados. Os resultados obtidos com o presente trabalho sugerem que a tecnologia fermentativa CSbE-MCB apresenta um grande potencial para viabilização da produção biotecnológica de surfactantes.

Palavras-chave: Ramnolípídeos. Biosurfactantes. *Pseudomonas aeruginosa*. Membrana de celulose bacteriana. Cultivos estáticos e biofilme.

CONCEIÇÃO, Karen Stefany. **Rhamnolipids production by static-submerged cultures using membranes of bacterial cellulose as support support**. 2018. 96 p. Dissertation (Master's Degree Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Rhamnolipids are biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*, which tend to distribute at the oil / water and water / oil interfaces. These biomolecules have great market potential because of their low toxicity, high environmental compatibility and biodegradability. However, the application of these compounds is still limited because of their high cost of production in comparison to the chemically synthesized congeners. Rhamnolipid production by static-submerged cultivation using membranes of bacterial cellulose as solid support (SSbC-MBC) is an alternative promising method that avoids the characteristic foaming of the production of biosurfactants by classic submerged fermentation. The formation of foam is a serious problem, as it entails loss of biomass and nutrients, reduces the production rates or even makes the process unfeasible. Another advantage of the SSbC-MBC is the low operating cost, since the membranes are reusable and the process is static, consequently, there is no need for additional energy costs for aeration and agitation. The aim of the present work was to develop a process of rhamnolipids production by SSbC-MBC and perform their structural- (congener mixture) and physicochemical-characterization [surface tension, emulsion index IE and critical micellar concentration (CMC)]. In addition, was evaluated a series of strategies to improve the rhamnolipids yields reached by this fermentative technology. The composition of the rhamnolipids mixture obtained by this fermentation technology presents a greater percentage of di-rhamnolipids (95%), being the most abundant congener Rha-C₁₀-C₁₀ (66 %), reaching a single molecule is required for more refined applications such as use as a potential drug. The CMC determined was 42.3 mg / L, in general lines the mixture of rhamnolipids obtained in the present process presented a CMC that is among the best results for rhamnolipids found in the scientific literature. The mixture presented a high emulsifying power, showing greater emulsifying power for kerosene, higher than 80 %. The SSbC-MBC of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 using a single membrane of bacterial cellulose covered with 3 mL of culture medium, with addition of corn-bran aqueous-extract (1:1) plus glycerol 6 % v/v, and statically incubated at 37°C for 9 days reached 15.34 g/L of the extracted and recovered rhamnolipids. The results of the present work suggest that this fermentative technology, SSbC-MBC, presents a great potential to make feasible the biotechnological production of surfactants.

Key words: Rhamnolipid. Biosurfactants. *Pseudomonas aeruginosa*. Membrane of bacterial cellulose. Static cultivation. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.....	17
Figura 2 -	Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo	18
Figura 3 -	Estruturas químicas de alguns biossurfactantes	21
Figura 4 -	Estrutura química dos principais homólogos de ramnolipídeos	27
Figura 5 -	Esquema da rota metabólica da produção de ramnolipídeos.	29
Figura 6 -	Vias metabólicas de fermentação do glicerol.	33
Figura 7 -	Fórmula estrutural da celulose com suas ligações glicosídicas β -(1-4). Entre colchetes destaca-se a celobiose, unidade básica de repetição na cadeia.....	37
Figura 8 -	Fluxograma da metodologia.....	39
Figura 9 -	Micrografias eletrônicas de varredura de membranas de celulose bacterianas colonizadas ou não por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	48
Figura 10 -	Teste de emulsificação para hexano, querosene, gasolina e diesel, nas concentrações de 0,1 g/% e 0,05 g/%.....	51
Figura 11 -	Cromatografia em Camada Delgada dos ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático com membrana de celulose bacteriana	53
Figura 12 -	Perfis de massa obtidos da mistura de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana	55
Figura 13 -	Estruturas dos principais congêneres de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana	56
Figura 14 -	Comparação de diferentes alturas de volume inicial de meio em cultivos submersos estático em suporte de membrana de celulose bacteriana	63

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Determinação da concentração micelar crítica a partir de diluições seriais de solução aquosa de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana50
- Gráfico 2** - Índice de emulsificação, frente a diferentes hidrocarbonetos, de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana52
- Gráfico 3** - Avaliação da relação da quantidade de Membrana de Celulose Bacteriana e relação com a biomassa Cultivo Submerso Estático com Suporte de Celulose Vegetal (CSbE-CV)57
- Gráfico 4** - Cinética de produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos em suporte de celulose bacteriana utilizando 10 mL de volume inicial de meio58
- Gráfico 5** - Avaliação da adição de água ou meio de cultivo nos cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana60
- Gráfico 6** - Avaliação da adição de água nos cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana.....61
- Gráfico 7** - Comparação da produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos, cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana e com celulose vegetal62
- Gráfico 8** - Produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos em suporte de celulose bacteriana. Avaliação de diferentes alturas de leitos64
- Gráfico 9** - Produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos com diferentes alturas de leito na presença e na ausência de membrana de celulose bacteriana65
- Gráfico 10** - Produção de ramnolipídeos com diferentes alturas de leito por cultivos submersos e cultivos submersos estáticos ambos com presença de membrana de celulose bacteriana67

- Gráfico 11** - Produção de ramnolipídeos com a utilização de óleo de soja e extrato aquoso de torta de milho como suplementos indutores de produção de ramnolipídeos por cultivos submersos e cultivos submersos estáticos ambos com presença de membrana de celulose bacteriana69
- Gráfico 12** - Produção de ramnolipídeos com a utilização de diferentes quantidades de glicerol acrescentados em duas proporções de extrato aquoso de torta de milho em cultivos submersos estáticos em suporte de membrana de celulose bacteriana70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais classes de biossurfactantes produzidos por microrganismo.....	20
Tabela 2 -	Diferentes espécies de <i>Pseudomonas</i> e outros gênero descritos como produtores de ramnolipídeos.....	22
Tabela 3 -	Diferentes cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizadas para a produção de ramnolipídeos.....	23
Tabela 4 -	Comparação da produção de ramnolipídeos (g/L ⁻¹) usando diferentes fontes de carbono.....	30
Tabela 5 -	Materiais utilizados na realização dos experimentos	38
Tabela 6 -	Comparação da produção de ramnolipídeos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 e PAO1 por cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana, cultivos submersos e cultivos submersos estáticos	46
Tabela 7 -	Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de membranas de celulose bacteriana.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CMC	Concentração Micelar Crítica
CSb	Cultivo Submerso
CSbE	Cultivo Submerso Estático
CSbE-CV	Cultivo Submerso Estático em Suporte de Celulose Vegetal
CSbE-MCB	Cultivo Submerso Estático em Suporte de Membrana de Celulose Bacteriana
CSbE-MCB_1%-OS	Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana com 1% de Óleo de Soja
CSbE-MCB_EA-TM	Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana com Extrato Aquoso de Torta de Milho
Dtdp	Difosfato de Desoxitimidina
E	Índice de Emulsificação
E ₂₄	Índice de Emulsificação por 24 horas
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HAA	3-(3-hidroxi)alcanoiloxi)-alcanoato
LC-QTOF	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
MCB	Membrana de Celulose Bacteriana
TS	Tensão Superficial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	GERAL	14
2.2	ESPECÍFICO	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	ATIVIDADE SURFACTANTE	17
3.2	BIOSURFACTANTES	18
3.2.1	Classificação dos Biosurfactantes	19
3.3	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	22
3.4	RAMNOLÍPÍDEOS	24
3.4.1	Estrutura de Ramnolípídeos	26
3.4.2	Biossíntese de Ramnolípídeos	27
3.4.3	Produção de Ramnolípídeos	29
3.4.3.1	Glicerol como fonte de carbono	32
3.5	APLICAÇÕES ECONÔMICAS DOS RAMNOLÍPÍDEOS	33
3.6	INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E PROFUNDIDADE DE LEITO NO MEIO DE CULTIVO	34
3.7	FORMAS ALTERNATIVAS DE PRODUÇÃO	35
3.8	MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA	36
4	MATERIAL DE MÉTODOS	38
4.1	MATERIAL	38
4.1.1	Microrganismo	38
4.1.2	Preparo do Pré-Inóculo	40
4.1.3	Cultivos Submersos (CSb)	40
4.1.4	Cultivos Submersos Estáticos (CSbE)	40
4.1.5	Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana (CSbE-MCB)	41
4.1.6	Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Celulose Vegetal (CSbE-CV)	41

4.1.7	Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana com Óleo de Soja (CSbE-MCB_1%OS).....	41
4.1.8	Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana com Extrato Aquoso de Torta de Milho (CSbE-MCB_EA-TM).	41
4.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	42
4.2.1	Determinação do Crescimento Bacteriano do Pré-Inóculo.....	42
4.2.2	Extração dos Ramnolipídeos	42
4.2.3	Quantificação dos Ramnolipídeos.....	42
4.2.4	Determinação da Tensão Superficial	43
4.2.5	Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	43
4.2.6	Determinação do Índice de Emulsificação (E).....	43
4.2.7	Determinação da Mistura de Congêneres de Ramnolipídeos Produzidos por Cultivo Submerso Estático em Suporte de Membrana de Celulose Bacteriana por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-QTOF).....	44
4.2.8	Cromatografia Líquida em Camada Delgada (CCD).....	44
4.2.9	Microscopia Eletrônica de Varredura	45
4.2.10	Análise de Volume Residual	45
4.2.11	Quantificação da Biomassa.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	ESTUDOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> EM SUPORTE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA.....	46
5.2	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ADESÃO CELULAR NA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	47
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES POR CULTIVOS SUBMERSOS ESTÁTICOS COM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA	49
5.3.1	Determinação da Tensão Superficial (TS) e Concentração Micelar Crítica (CMC)	49
5.3.2	Determinação do Índice de Emulsificação (E).....	50
5.3.3	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	53

5.3.4	Determinação da Mistura de Congêneres de Ramnolipídeos Produzidos por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-QTOF).....	54
5.4	QUANTIDADE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA E RELAÇÃO COM A BIOMASSA E A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS	57
5.5	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAO1 EM CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO COM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA	58
5.6	ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DE PROFUNDIDADE DO LEITO DE CULTIVO DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO COM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA	59
5.6.1	Adição de Água Destilada ou Meio de Cultivo Durante a Fase Exponencial de Produção em Cultivo Submerso Estático com Suporte de Membrana de Celulose Bacteriana.....	59
5.6.2	Cultivo Submerso Estático com Suporte de Celulose Vegetal (CSbE-CV)	61
5.6.3	Comparação da Profundidade de Leito de Cultivo em Diferentes Volumes Iniciais de Meio de Cultivo Submerso Estático com Suporte de Membrana de Celulose Bacteriana.....	63
5.6.4	Comparação da Profundidade de Leito de Cultivo com Ausência e Presença da Membrana de Celulose Bacteriana em Cultivo Submerso Estático	65
5.6.5	Avaliação do Efeito da Agitação dos Cultivos com Presença de Celulose Bacteriana e em Diferentes Profundidades de Leito	66
5.7	ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO	68
5.7.1	Utilização de óleo de soja e extrato aquoso de torta de milho como suplemento indutor de produção de ramnolipídeos.....	68
5.8	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS OBTIDOS POR CULTIVOS SUBMERSOS ESTÁTICOS EM SUPORTE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA	71
6	CONCLUSÕES	72

7	SUGESTÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS	73
7.1	DELINEAMENTO ESTATÍSTICO DO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL E DA PROPORÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE TORTA DE MILHO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS	73
7.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA DA MISTURA DE RAMNOLIPÍDEOS OBTIDA A PARTIR DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	73
7.3	ÁVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ADESÃO À MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA DA ESTIRPE PARENTAL DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAO1 TRANSFORMADA COM PLASMÍDEO QUE EXPRESSA A PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP) POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E POR MICROSCOPIA CONFOCAL DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CSBE-MCB.....	73
8	REFERÊNCIAS	74
9	ANEXOS	94
	ANEXO 1 – Pedido de patente dos dados obtidos com a presente dissertação	95
	ANEXO 2 – Composição centesimal da torta de milho	96

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos com atividade tensoativa constituídas por dois domínios, um hidrofóbico e outro hidrofílico. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. São exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente, ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (NITSCHKE; PASTORE, 2011; LIU et al., 2016; REDDY et al., 2016; VARJANI; UPASANI, 2017).

A grande maioria dos surfactantes presentes no mercado são de origem química, porém há um grande interesse na substituição dos surfactantes químicos pelos de origem biológica, pois estes apresentam vantagens (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; ARAUJO et al., 2016; RADZUAN, M. N.; BANAT, I.; WINTERBURN, J., 2016;). Ao serem comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam: desempenho superior em situações extremas de temperatura, pH e salinidade; baixa toxicidade e biodegradabilidade (BELLO et al., 2012; LOVAGLIO et al., 2011; NITSCHKE; PASTORE, 2011; VARJANI, 2017; JOY; RHAMAN; SHARMA, 2017). Responsáveis por reduzir a tensão superficial das interfaces óleo/água ou ar/água, esses compostos apresentam seu maior potencial de aplicação em situações onde se tem a necessidade da dispersão de tensoativos no meio-ambiente, entre estas, duas se destacam: 1) utilização em limpeza de derramamentos de óleo e outros compostos hidrofóbicos; e 2) na utilização para aumentar a recuperação de óleo (petróleo) em reservatórios do inglês “MEOR” (*microbial enhanced oil recovery*). Nestas duas aplicações o uso de surfactantes de origem biológica é a opção mais adequada, visto que surfactantes químicos podem causar efeitos ambientais tóxicos (CAMILIOS NETO et al., 2011; REDDY et al., 2016; SANTOS et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem ramnolipídeos, um biossurfactante da classe dos glicolipídeos. Os ramnolipídeos estão entre os mais estudados dos surfactantes microbianos, e o interesse por estes compostos é motivado por benefícios como: i) possuírem ótimas propriedades tensoativas; e ii) serem produzidos em altas taxas, a partir de fontes de baixo custo, substratos hidrofílicos (carboidratos) e hidrofóbicos (óleos vegetais, hidrocarbonetos) ou mesmo efluentes de indústrias de alimentos (KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL,

2010; CAMILIOS-NETO et al., 2008; LEE et al., 2004; REDDY et al., 2016; BAI; MCCLEMENTS, 2016). No entanto, apesar dos ramnolipídeos possuírem características surfactantes eficazes, o custo de produção ainda é muito elevado, podendo ser até 10 vezes superior, quando comparado aos similares de origem química (CAMILIOS-NETO et al., 2011).

A produção de biossurfactantes por cultivos submersos (fermentação submersa - FS) enfrenta um problema severo com a formação de espuma. Os processos são conduzidos com agitação e aeração forçada, assim, quando o biossurfactante começa a ser produzido, grandes quantidades de espuma são formadas, e há uma tendência das células do microrganismo produtor acumularem-se nesta espuma. Desta forma, se a formação da espuma não for contida, a fermentação fica altamente prejudicada, pois junto com a espuma, que sai do reator, há saída e conseqüente perda de nutrientes, produtos e biomassa, reduzindo a produtividade, ou até mesmo inviabilizando a fermentação (CAMILIOS NETO et al., 2008; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010; RAMÍREZ et al., 2016). Assim, a eficiência da estratégia de controle de espuma é essencial para garantir a viabilidade do processo, além de gerar dificuldades operacionais (KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um processo de produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos sobre membrana de celulose bacteriana com potencial de evitar a formação de espuma e viabilizar a produção de ramnolipídeos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver um processo de produção, extração, purificação e caracterização físico-química e estrutural de ramnolipídeos obtidos por cultivo submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana.

2.2 ESPECÍFICO

- Comparar a produção de ramnolipídeos por cultivos submersos, cultivos submersos estáticos e cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e PAO1;
- Determinar a cinética de produção de ramnolipídeos obtidos por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana;
- Avaliar o padrão de adesão da *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana por microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar o índice de emulsificação dos ramnolipídeos produzidos por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana;
- Determinar a concentração micelar crítica dos ramnolipídeos produzidos por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana;
- Determinar a mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e cromatografia em camada delgada;

- Avaliar a influência da área de superfície por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana na produção de ramnolipídeos;
- Avaliar a influência agitação em cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana na produção de ramnolipídeos;
- Avaliar o efeito de profundidade do leito de cultivo durante a produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos com membranas de celulose bacteriana;
- Avaliar estratégias para aumentar a produção de ramnolipídeos obtidos por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Surfactantes são compostos químicos com propriedades tensoativas extensamente utilizados em várias indústrias. Apresentam propriedades surfactantes responsáveis por reduzir a tensão superficial das interfaces óleo/água e ar/água. Estas moléculas anfipáticas, compostas por porções hidrofóbicas e hidrofílicas, apresentam excelentes propriedades detergentes, emulsificantes, espumantes e dispersantes (LIU et al., 2016; HERYANI; PUTRA, 2017). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. São exemplos de surfactantes iônicos, utilizados comercialmente, ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (NITSCHKE; PASTORE, 2002; REDDY et al., 2016; BRUMANO et al., 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

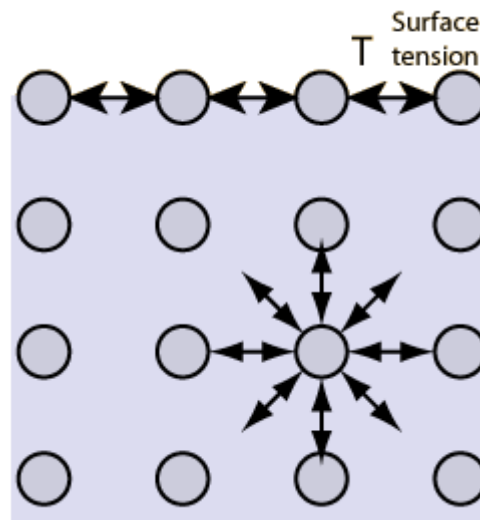
O interesse em surfactantes de origem microbiana cresce continuamente devido ao leque de possibilidades de aplicação ecologicamente corretas, tais como: na estabilização de formulações óleo-em-água (BANAT, et al., 2010), proteção do ambiente por meio da biorremediação de solo contaminado com petróleo, fitoextração de metais pesados (RODRIGUES et al., 2006), extração e transporte de petróleo em tubulações, limpeza de tanques de armazenagem e gerenciamento de derramamentos de óleo, assim como na recuperação de petróleo melhorada microbiologicamente (MEOR – microbial enhanced oil recovery) (WANG, et. al., 2007; REDDY et al., 2016; ZHAO et al., 2017).

A maioria dos agentes tensoativos comercialmente acessíveis hoje são surfactantes químicos tradicionais sintetizados a partir de fontes petroquímicas não renováveis. Esses compostos vêm sendo utilizados na indústria do petróleo para auxiliar a limpeza, no caso de derramamentos, e para melhorar a recuperação de óleo dos reservatórios. Os surfactantes de origem química são recalcitrantes, não apresentam compatibilidade ambiental e representam um risco potencial ao ambiente. Assim, cada vez mais se amplia o interesse na substituição destes compostos por seus congêneres de origem biológicos (APARNA et al., 2012; LIU et al., 2016; ELSHIKHA et al., 2017).

3.1 ATIVIDADE SURFACTANTE

A atividade de um surfactante pode ser avaliada através de indicadores tais como, diminuição da tensão superficial e da tensão interfacial, assim como a concentração micelar crítica (CMC). De forma que minimize sua área de superfície, os líquidos tendem a manter as moléculas mais unidas. As forças coesivas entre as moléculas no interior do líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos e as gotas tendem a assumir uma forma esférica, pois é a forma com menor razão superfície/volume. Aquelas da superfície não têm átomos vizinhos acima delas, e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado tensão superficial (Figura 1) (PIRÔLLO, 2006; APARNA et al., 2012; LIU et al., 2016).

Figura 1– Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.

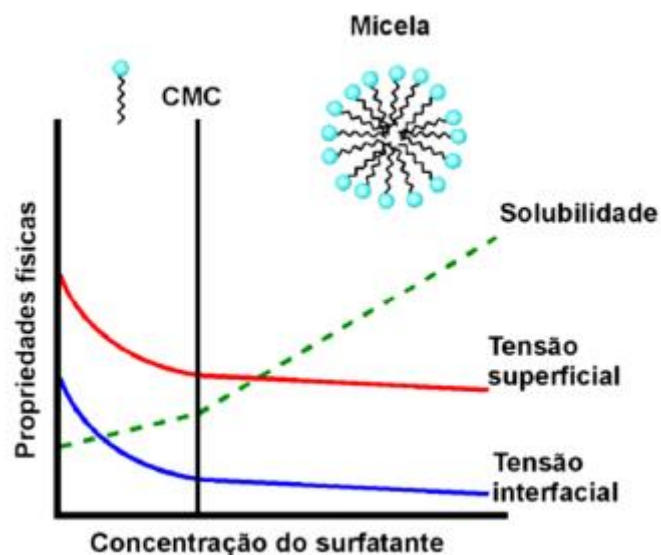


Fonte: Adaptado de PIRÔLLO (2006)

A tensão superficial entre as interfaces ar/água e óleo/água podem ser medidas utilizando um tensiômetro. Quando um surfactante é adicionado a esse sistema em concentrações crescentes, observa-se uma redução na tensão superficial até um valor crítico, a partir do qual as moléculas se associam formando estruturas supramoleculares como micelas. A tensão superficial da água destilada é 72 mN/m, a adição de surfactante reduz este valor para valores próximos a 30 mN/m

(DESAI; BANAT, 1997). A capacidade de formar micelas confere aos surfactantes as propriedades de detergência e solubilização de compostos hidrofóbicos. A mínima concentração de surfactantes em solução necessária para formação de micelas é conhecida como concentração micelar crítica (CMC) e é usada comumente para medir a eficiência do surfactante, quanto menor for esta concentração mais potente será o surfactante (Figura 2) (COOPER, 1986; CAMILIOS NETO, 2010; HERYANI, PUTRA, 2017).

Figura 2 – Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo.



Fonte: Adaptado de MULLIGAN (2001)

3.2 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são uma variedade de metabólitos produzidos por microrganismos e diferem em suas propriedades químicas e tamanho molecular (BANAT et al., 2010; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011; VARJANI; UPASANI, 2017). O caráter anfipático destes compostos assegura uma grande aplicabilidade na indústria agindo como agente tensoativo e emulsificante principalmente em alimentos, formulações farmacêuticas e cosméticas. Estes compostos são produzidos a partir de diversas espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BANAT et al., 2010). Os biossurfactantes

se sobressaem sobre seus congêneres de origem química por apresentarem um conjunto de vantagens como: (1) baixa toxicidade; (2) tolerância a pH, temperatura e salinidade; (3) biodegradabilidade; e (4) alto poder tensoativo nas interfaces líquido-ar e líquido (DELEU; PAQUOT, 2004; JOY; RHAMAN; SHARMA, 2017; SANTOS et al., 2017).

3.2.1 Classificação dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser classificados por sua origem microbiana ou por sua estrutura química e dividem-se em compostos de alta e baixa massa molecular. Os polímeros de polissacarídeos, os lipopolíssacarídeos, as proteínas e as lipoproteínas são biossurfactantes de alta massa molecular, enquanto lipopeptídeos, glicolipídeos e ácidos graxos são os de baixa massa molecular (BANAT et al., 2010). Como previamente relatado, biossurfactantes derivados de microrganismos apresentam muitas vantagens sobre os seus homólogos químicos, no entanto, o elevado custo de produção, quando comparados com os congêneres sintéticos, faz com que ainda não sejam amplamente utilizados (LOVAGLIO et al., 2011; NITSCHKE; PASTORE, 2011; BORAH et al, 2015; BELLO et al., 2012).

As diferentes classes de biossurfactantes (glicolipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipoproteínas, lipopeptídeos e os surfactantes poliméricos) estão apresentadas na Tabela 1, enquanto, as principais estruturas químicas, dos biossurfactantes mais estudados, estão apresentadas na Figura 3 (MONTEIRO, 2007; NITSCHKE; PASTORE, 2002; SANTOS, et al., 2016). Grande parte dos biossurfactantes são aniônicos ou neutros, constituídos por uma porção hidrofóbica constituída por ácidos graxos de cadeia longa ou por derivados de ácidos graxos, já a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico ou fostato (RAMÍREZ et al., 2016).

Tabela 1 – Principais classes de biossurfactantes produzidos por microrganismos.

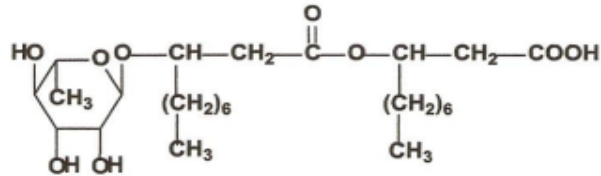
Classe	Biossurfactante	Microrganismo	Referências
Glicolipídeos	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KRONEMBERGER, 2007; CAMILIOS-NETO, 2010; ISMAIL <i>et al.</i> , 2015; LONG <i>et al.</i> , 2016; TAHSEEN <i>et al.</i> , 2016; JADAV <i>et al.</i> , 2017
		<i>Pseudoxanthomonas</i>	NAYAK <i>et al.</i> , 2009
		<i>Serratia rubidea</i>	NALINI, S.; PARTHASARATHI, R, 2014
	Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i>	ITO, S.; IINOUE, S., 1982
		<i>Torulopsis apícola</i>	STÜWER <i>et al.</i> , 1987
		<i>Candida bombicola</i>	FELSE <i>et al.</i> , 2006; KURTZMAN <i>et al.</i> , 2010; GUPTA, R. 2012; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2014
	Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ZARAGOZA <i>et al.</i> , 2013
Ácidos graxos, Lipídeos neutros e Fosfolipídeos	Ácidos graxos Lipídeos neutros Fosfolipídeos	<i>Corynebacterium lepus</i>	DUYNJAK, Z.; KOSARIC, N., 1985; COOPER, D. G.; ZAKIJ, J. E.; GERSON, D. F.; 1979
Lipoproteínas e Lipopeptídeos	Peptídio-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>	YAKIMOV; TIMMIS; FREDRICKSON, 1995
	Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>	SALGADO, 2013
	Subtilisina e surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	VALPUESTA, 2008; HERYANI; PUTRA, 2017; JADAV <i>et al.</i> , 2017; SHEPPARD; MULLIGAN, 1987
Surfactantes Poliméricos	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	RUFINO <i>et al.</i> , 2014; SANTOS <i>et al.</i> , 2016
	Emulsan e biodispersan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>	RUBINOVITZ, D.; GUTNICK, D. L.; ROSENBERG, E., 1982

Fonte: o próprio autor

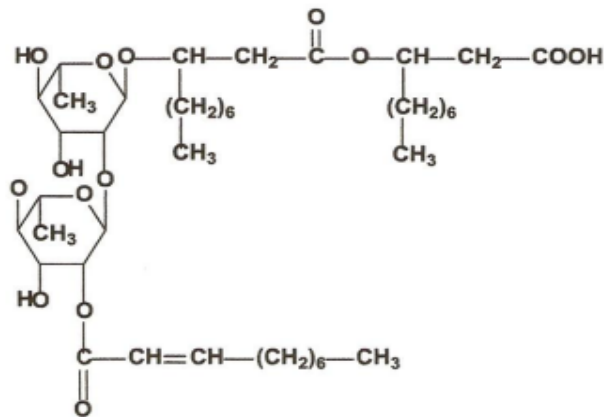
Figura 3 – Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.

A) Ramnolípido produzido por *Pseudomonas aeruginosa*:

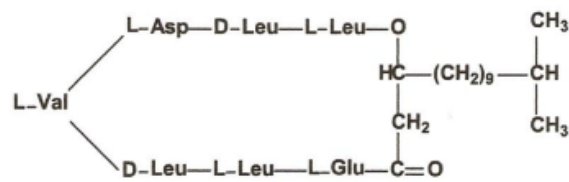
Mono-ramnolípido RL-1



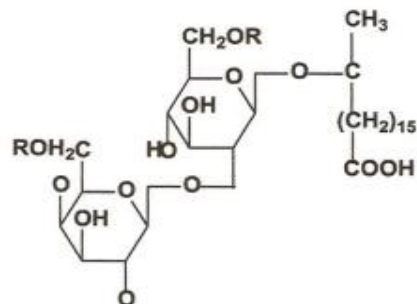
Di-ramnolípido RL2



B) Surfactina produzido por *Bacillus subtilis*:



C) Soforolípido produzido por *Torulopsis magnoliae*:



3.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

O gênero *Pseudomonas* compreende um táxon de organismos metabolicamente versáteis capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos simples ou complexos. São constituídos por bacilos, e possuem características como serem gram-negativos aeróbicos, retos ou levemente curvos, apresentarem motilidade por meio de um ou mais flagelos polares e utilizam glicose e outros carboidratos por oxidação, e na grande maioria são citocromo-oxidase positivas (DAS et al., 2005; HILL; HENRY, 2007; SIVASAMY et al., 2016).

A produção de biosurfactantes por bactérias do gênero *Pseudomonas* é amplamente relatada, com destaque para as *Pseudomonas aeruginosa* (Tabelas 2 e 3) (HABA et al., 2003; SANTANA FILHO, 2009), que são as que mais se destacam na produção (MÜLLER et al., 2012). O gênero também é conhecido por ser um patógeno humano oportunista, principalmente a *Pseudomonas aeruginosa*, que apresenta habilidade de causar sérias infecções e desenvolvimento em quantidades mínimas de fontes de carbono (TORTORA et al., 2012). A produção de ramnolipídeos tem sido descrita para diferentes espécies *Pseudomonas* e outros gêneros (Tabela 2). No entanto, mais atenção tem sido dada para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, devido inclusive ao fato dos ramnolipídeos serem um fator de virulência, e a importância desta espécie como patógeno, além da complexidade genética e da grande versatilidade ambiental. O genoma bem anotado da *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, cepa isolada de ambiente hospitalar e sequenciada (STOVER et al. 2000), torna promissora a sua manipulação genética. Esta espécie apresenta um grande potencial para aplicação biotecnológica (REIS, 2008), com destaque para a própria cepa PAO1, considerada um modelo para a produção de ramnolipídeos (MÜLLER, et al., 2010, 2012).

Tabela 2 - Diferentes espécies de *Pseudomonas* e outros gênero descritos como produtores de ramnolipídeos.

Espécies	Referências
<i>Pseudomonas putida</i>	BONILLA et al., 2005; JOHANN et al., 2016

Espécies	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CAMILIOS-NETO, 2010; RAMIREZ et al., 2016
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	OLIVEIRA et al., 2009
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	GUNTHER et al, 2006
<i>Pseudomonas clemancea; P. collierea</i>	RAHMAN et al., 2009
<i>Pseudomonas cepacia, P. fluorescens, P. luteola, P. shutzeri, P. teessidea</i>	OBASLI; ASLIM, 2009
<i>Pantoea, Acinetobacter, Enterobacter</i>	RONEY et al., 2009
<i>Burkholderia</i>	ANDRÄ et al., 2006; DUBEAU et al., 2009; HÄUSSLER et al.1987.
<i>Pseudoxanthomonas</i>	NAYAK et al., 2009

Fonte: o próprio autor

Tabela 3 - Diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas para a produção de ramnolipídeos.

Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Referências
ZJU211	LONG et al., 2016
R25, R21 e R7	TAHSEEN et al., 2016
AK6U	ISMAIL et al., 2015
MSIC02	SOUSA et al., 2014
CCMICS 106 e 109	DAMIAO, 2012
ATCC 9027	ALMEIDA, 2011
UFPEDA 614; PAO1	CAMILIOS-NETO, 2010
PAO1	MÜLLER et al., 2010

Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Referências
P029-GVIA	OLIVEIRA, 2010
LMI 6c e 7 ^a	COSTA, 2010
PA1	KRONEMBERGER, 2007
UFPEDA 614	MONTEIRO, 2007
LBI	PIROLLO, 2006

Fonte: o próprio autor

Pseudomonas aeruginosa pode se desenvolver a partir de fontes renováveis tais como, óleos vegetais, óleo vegetal, gordura animal, efluentes de indústrias de óleo de oliva, soro de leite e efluentes ricos em amido e entre os substratos não lipídicos, destacam-se o glicerol, a glucose e o manitol. Podendo ser isolada de diferentes habitats incluindo o solo, a água e plantas (HABA et al., 2003).

3.4 RAMNOLIPÍDEOS

Os ramnolipídeos foram inicialmente descritos como metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa*, produzidos e excretados no espaço extracelular (JARVIS; JOHNSON, 1949). Estão entre os biossurfactantes mais estudados e promissores, apresentam excelente atividade tensoativa, biodegradabilidade, baixa toxicidade e são produzidos em altas concentrações (HABA et al., 2003; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011; LONG et al., 2016; ELSHIKHA et al., 2017). Pertencem a classe dos glicolipídeos e podem ser isolados de determinados microrganismos, porém em geral são predominantemente secretados por *Pseudomonas aeruginosa* (BAI; MCCLEMENTS, 2016; RAMÍREZ et al., 2016; LONG et al., 2016).

A composição e as propriedades destes compostos dependem da estirpe microbiana, condições de cultivo e substratos utilizados para produzi-los (OLIVEIRA, 2010; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). São secretados como uma mistura heterogênea de mono- (ramnosil- β - hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato) e di-

ramnolipídeos (L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato), diferentes tipos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produzem diversos homólogos estruturais de ramnolipídeos. (MONTEIRO, 2007; LOVAGLIO, 2011).

Baseado nas funções fisiológicas acredita-se que os ramnolipídeos são importantes na mobilidade celular, interações célula-célula, acessos aos substratos hidrofóbicos, fatores de virulência, expulsão de compostos tóxicos das células e formação de canais de água que são característicos em biofilmes (NEALSON et al., 1970; MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; DAVEY; CAIAZZA; O'TOOLE, 2003).

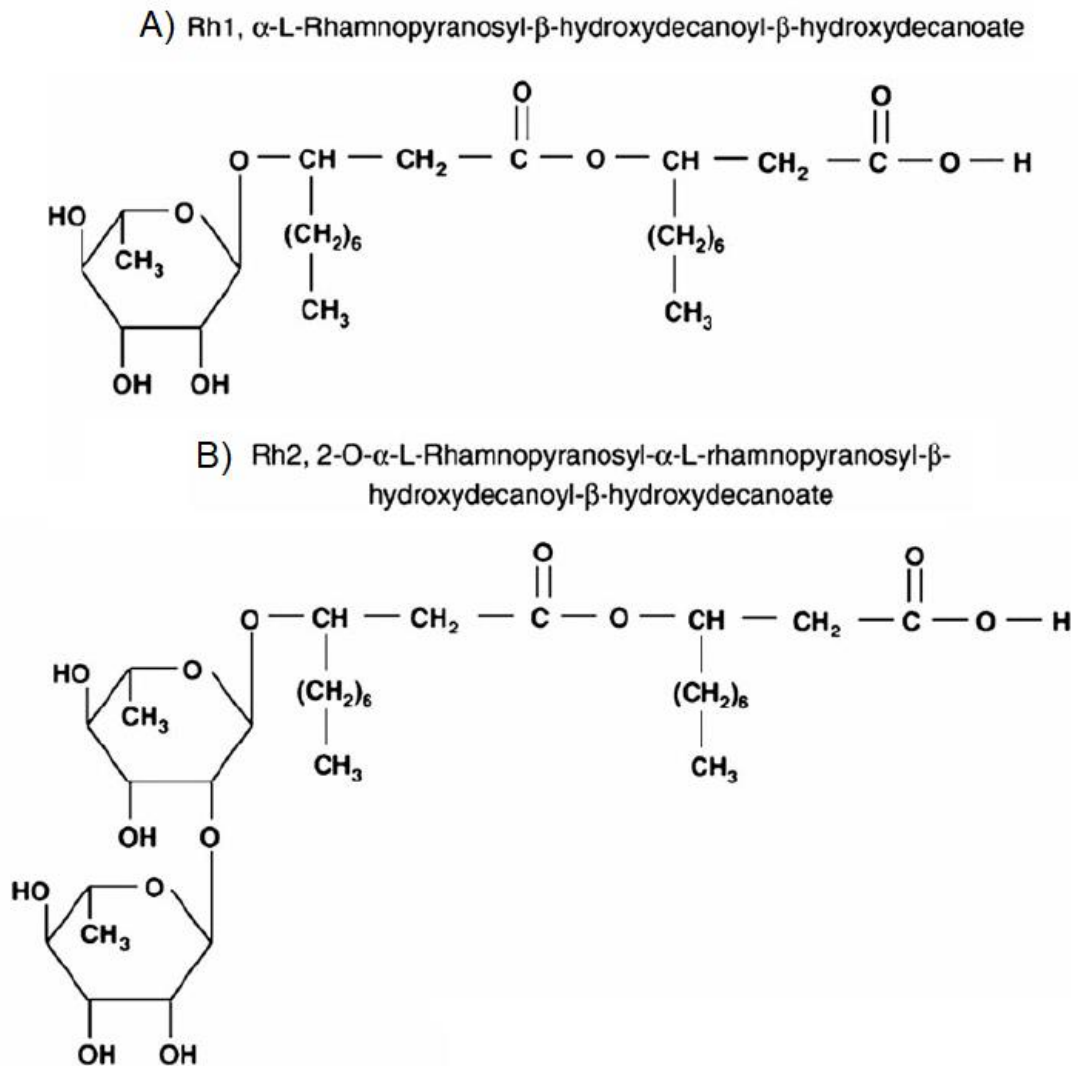
Por causa da estrutura química, os ramnolipídeos apresentam uma ampla gama de aplicações potenciais em vários setores industriais, dentre as principais estão: (1) Indústria do petróleo, na biorremediação e recuperação melhorada do petróleo (MEOR Microbial Enhanced Oil Recovery) em que demonstram excelentes propriedades de emulsificação, remoção eficiente de petróleo bruto e de solo contaminado, além de facilitar a biorremediação de derramamentos de petróleo; (2) Indústria farmacêutica, produtos farmacêuticos e terapêuticos pelo fato de serem agentes tensoativos e apresentarem baixa toxicidade, adicionalmente apresentam propriedades antimicrobianas contra *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*; (3) Indústria cosmética, como ingrediente ativo em tratamentos de pele, diminuição de fibrose e tratamento de rugas; (4) Indústria de produtos de higiene e limpeza, em produtos de lavanderia, shampoos e sabões; (5) Indústria de alimentos, com importante papel na formação da textura e consistência, bem como na solubilização de aromas e na dispersão de fase; (6) Indústria agrícola, na remediação de solos, no controle de fitopatógenos, como biopesticidas e para auxiliar a absorção de fertilizantes e nutrientes (NITSCHKE; COSTA, 2007; COSTA et al., 2006, 2010; RANDHAWA; RAHMAN, 2014; LIU et al., 2016; REDDY et al., 2016; LEE et al., 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

3.4.1 Estrutura de Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos foram descritos primeiramente por BERGSTRÖM et al. (1946 a, b), como um óleo glicolipídico produzido por *Pseudomonas pyocianea* crescida em glicose, denominado ácido piolípico. Já a produção de glicolipídeos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* contendo ramnose em sua estrutura foi descrita primeiramente por JARVIS e JOHNSON (1949). Os ramnolipídeos são compostos por uma parte hidrofílica, composta por ramnose, e uma parte hidrofóbica, por ácido β -hidroxialcanóico (HAA). Sua classificação é conferida por conter uma (mono-ramnolipídeos) ou duas moléculas (di-ramnolipídeos) de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxialcanóico contendo de 8-14 átomos de carbonos. Os principais glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são dos tipos 1 e 2, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, respectivamente (Figura 4). Até a presente data mais de 60 congêneres ramnolipídicos já foram descritos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; WOZNIAK-KARCZEWSKA, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

A composição da mistura de homólogos, a presença de insaturações, o comprimento da cadeia alquílica e a composição da porção hidrofílica (uma ou duas moléculas de ramnoses) podem afetar propriedades físico-químicas destes compostos (MONTEIRO, 2007; LOVAGLIO, 2011). A carboxila do ácido β -hidroxialcanóico confere uma característica hidrofílica na porção hidrofóbica (Figura 4), o que fornece aos ramnolipídeos um caráter aniônico sobre condições de pH apropriadas (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2005; LONG, B; MCCLEMENTS, 2016; REDDY et al., 2016). A grande variedade estrutural deste biossurfactante está associada a inúmeras propriedades interessantes, como a solubilização de compostos hidrofóbicos, estabilização de emulsões, antimicrobianos e atividade e complexação de íons e metais pesados (CHRZANOWKI; LAWNICZAK; CZACZYK, 2012; WORZNIAK-KARCZEWSKA, 2017).

Figura 4 – Estrutura química dos principais homólogos de ramnolipídeos.



Fonte: Adaptado de MULLIGAN (2005)

3.4.2 Biossíntese de Ramnolipídeos

Ramnolipídeos são metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e, por isso, são sintetizados quando as células entram na fase estacionária de crescimento. Com base na via descrita por Burger, Glaser e Burton (1963), a biossíntese desses compostos ocorre em uma sequência de reações de transferência dos grupos glicosil para o 3-(3-hidroxi)alcanoiloxi)-alcanoato (HAA).

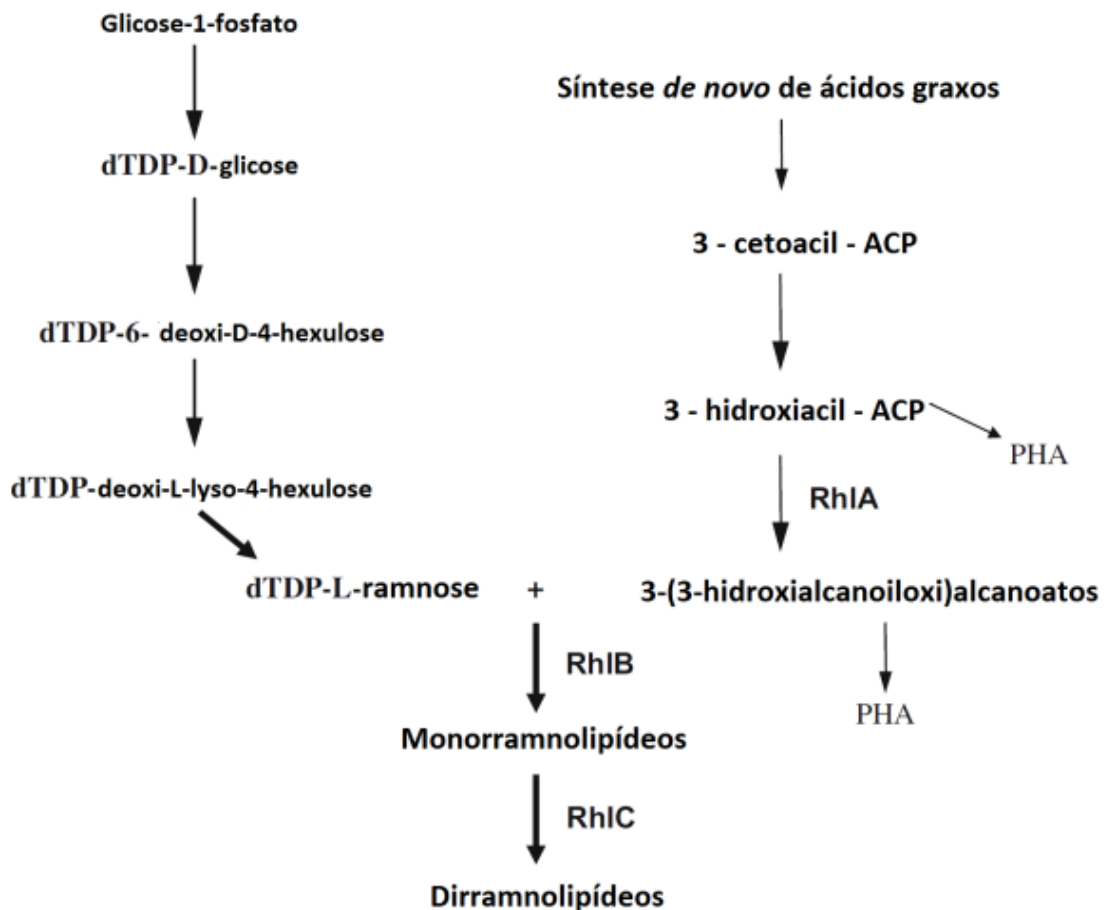
RhIA catalisa a formação de uma ligação éster entre os intermediários de ácidos graxos 3-hidroxiacil-ACP, formando o 3-(3-hidroxiaciloxi)-acanoato (HAA), correspondendo ao componente lipídico dos ramnolipídeos. Logo em seguida, a ramnosiltransferase I (RhIB) catalisa a formação de mono-ramnolipídeo empregando como precursores (Difosfato de Desoxitimidina - Dtdp)-L-ramnose e HAA, unindo-os por uma ligação O-glicosídica. Pela ação de RhIC é adicionado a esse complexo mais um grupo ramnosil, utilizando com precursor outro (Dtdp)-L-ramnose, por uma ligação α -1,2-glicosídica, formando o di-ramnolipídeo. Os principais genes que codificam a biossíntese de ramnolipídeos, regulação e indução das enzimas RhIA e RhIB estão organizados em um grupo gênico em que todos os genes estão transcritos na mesma direção, 5'-*rhlABRI*-3' enquanto que o gene *rhlC*, responsável pela adição do segundo grupo ramnosil ao mono-ramnolipídeo, se encontra em uma outra posição do cromossoma da *Pseudomonas aeruginosa*, juntamente com outro gene de função ainda desconhecida (Figura 5) (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011).

Como já mencionado, a biossíntese dos ramnolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa* baseia-se em três reações sequenciais catalisadas pelas proteínas correspondentes, RhIA, RhIB e RhIC. RhIA está associada com a síntese de HAA durante o primeiro passo, o RhIB permite o acoplamento de ramnose em HAA para formar mono-ramnolipídeos, enquanto RhIC governa a adição de outra ramnose, resultando na produção de di-ramnolipídeos (MAWGOUD; LEPINE; DEZIEL, 2010).

A regulação da produção de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa*, assim como de outros fatores de virulência desta bactéria, é coordenada pelo aumento da densidade celular através de um processo denominado *quorum sensing* (QS). O sistema QS é caracterizado pela síntese de moléculas difusíveis que coordenam a expressão genética dependente do crescimento celular. O QS pode ser descrito em quatro etapas: (1) síntese de moléculas sinalizadoras de pequeno porte; (2) liberação dessas substâncias indutoras; (3) recepção destas moléculas através de células adjacentes; e (4) alterações na regulação dos genes no momento em que há aumento da indução simultânea. O QS da *Pseudomonas aeruginosa*, controla centenas de genes, muitos dos quais codificam fatores de virulência, entre estes os genes responsáveis pela síntese dos ramnolipídeos

(SANDOZ; MITZIMBERG; SCHUSTER, 2007; REIS et al., 2011; SIVASAMY et al., 2016).

Figura 5 - Esquema da rota metabólica da produção de ramnolipídeos.



Fonte: SOBERÓN-CHÁVEZ; LEPINE; DÉZIEL (2005)

3.4.3 Produção de Ramnolipídeos

Assim como já abordado para biossurfactantes de maneira geral, a produção dos ramnolipídeos também apresenta altos custos quando comparada com aos congêneres de origem química. Os altos custos de produção destes compostos estão associados ao uso de substratos caros, à baixa produtividade e às etapas “downstream” do processo de produção. Uma estratégia para minimizar este

problema consiste na utilização de substratos oriundos de fontes alternativas, de origem renovável e de baixo custo, associadas à obtenção de concentrações elevadas de biossurfactante (HEYD et al., 2008; MÜLLER et al., 2012). A utilização de substratos alternativos como glicerol, borra oleosa, óleos usados entre outros constitui uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento da produção industrial de biossurfactantes, bem como redução dos custos do processo. Óleos vegetais e resíduos do refino destes estão entre os substratos alternativos mais utilizados na produção de ramnolipídeos (Tabela 4). A utilização de óleos nativos do Brasil como, buriti, babaçu, cupuaçu, maracujá, castanha-do-pará e andiroba como fontes de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* LBI proporcionaram bons níveis de produção de ramnolipídeos (COSTA, 2010).

Tabela 4 – Comparação da produção de ramnolipídeos (g/L^{-1}) usando diferentes fontes de carbono.

Cepa	Produção de ramnolipídeos g/L^{-1}	Fonte de Carbono	Tensão superficial mN m^{-1}	CMC mg/L^{-1}	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	0.39-0.43	Óleo de palma	29	420	RADZUAN; BANAT; WINTERBUR N, 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DR1	1,8	Óleo de semente de manga	29.96	80	REDDY <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	29,5	Hidrolisado de azeitona	46.6	-	Ramirez et al., 2016
<i>Pseudomonas</i> SWP-4	13,93	Resíduos de óleo de cozinha	24,1	-	LAN <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas putida</i> BD2	0,15	Glicose	31	0.13	JANEK; LUKASZEWIC Z; KRASOWSKA, 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	15,9	Glicerol	-	15,6	SANTANA FILHO, 2009

Cepa	Produção de ramnolipídeos g/L ⁻¹	Fonte de Carbono	Tensão superficial mN m ⁻¹	CMC mg/L ⁻¹	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 2297	2,2	Óleo de côco	24,02	-	GEORGE; JAYACHANDRAN, 2013
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 2874	45	Óleo de canola	-	-	TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UI 29791	46	Óleo de milho	-	-	LINHARDT <i>et al.</i> , 1987

Fonte: o próprio autor

A produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* está sujeita ainda a outros fatores além dos mecanismos de resposta ao *quorum sensing* (QS) e como o estresse por falta de nutrientes, por alterações no padrão de salinidade, temperatura, entre outros (SIVASAMY *et al.*, 2016). A relação carbono-nitrogênio (C/N) também é um dos fatores que influencia diretamente na produtividade de ramnolipídeos. Diferentes relações C/N podem ser encontradas na literatura, de 10 até 55 (RAZA *et al.*, 2007; ABOUSEOUD *et al.*, 2008). Alguns autores relatam haver uma relação entre aumento da relação C/N e produção de ramnolipídeos (MONTEIRO, 2007; SANTANA FILHO, 2009).

A fonte de nitrogênio também é um fator importante a ser considerado, uma vez que a limitação deste componente promove a síntese de ramnolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo alguns autores a produção é inibida na presença de glutamina, asparagina e arginina e promovida na presença de nitrato, glutamato e aspartato. Condições de crescimento e fatores ambientais, tais como temperatura, pH, agitação e oxigênio disponível podem afetar o crescimento celular, e conseqüentemente, a eficiência da produção de ramnolipídeos. As melhores produções de ramnolipídeos ocorrerem em pH em torno de 7,0, enquanto que em pH abaixo de 6 e acima de 8 ocorre uma redução drástica no crescimento bacteriano, o que leva também a uma grande diminuição na produção dos ramnolipídeos (LEE *et al.* 2004).

Embora ainda exista muitos desafios para se alcançar a obtenção em larga escala de ramnolipídeos, estes surfactantes microbianos são considerados

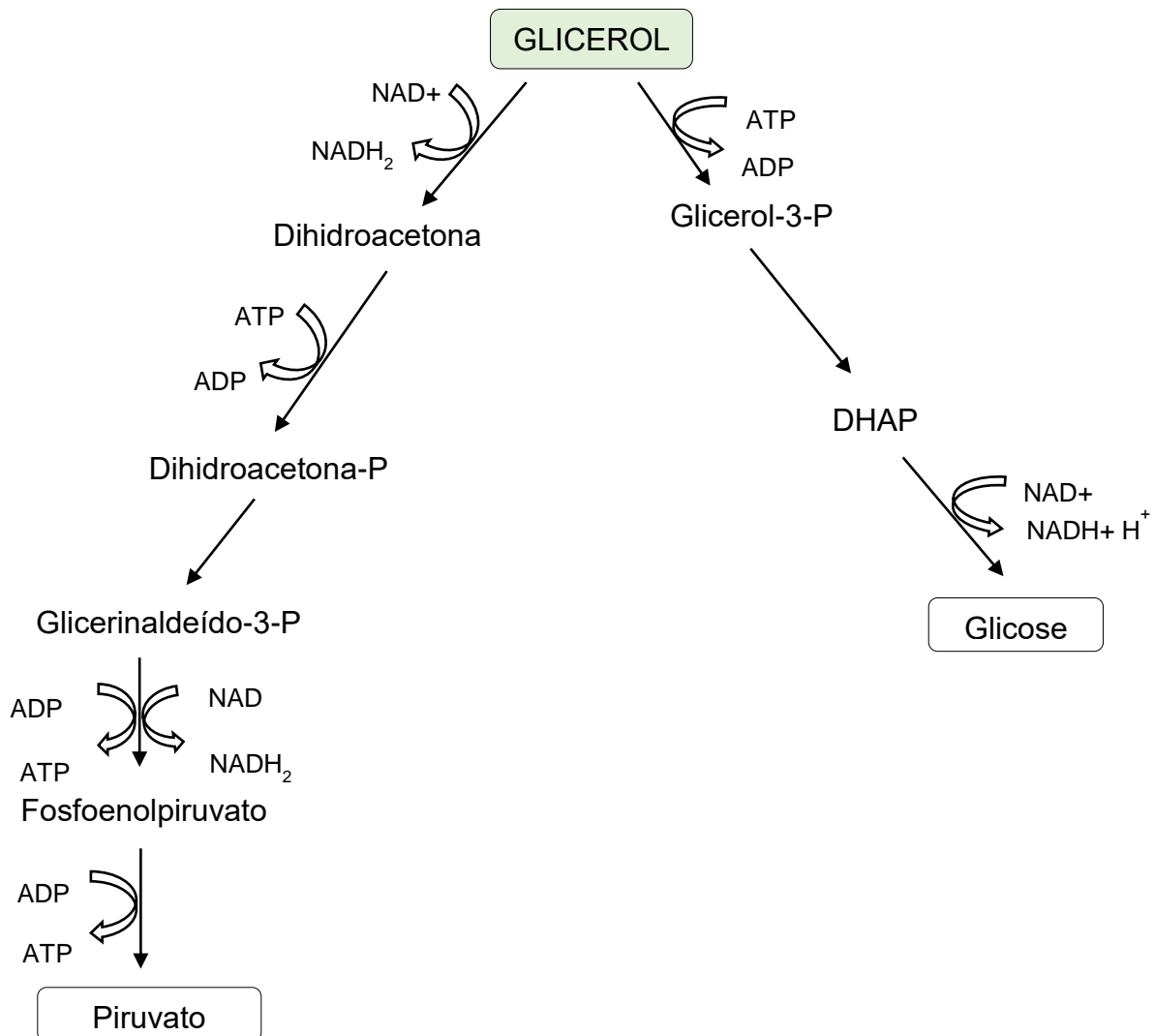
como a classe de biotensoativos mais promissora em termos de produção industrial. Apresentam características físico-químicas e biológicas peculiares e podem ser obtidos em altas concentrações, o que contribui para a difusão do uso destas moléculas, especialmente em situações onde o benefício da aplicação supera o custo da produção (DAMIAO, 2012).

3.4.3.1 Glicerol como fonte de carbono

O termo “glicerol” é empregado ao composto orgânico puro (teor maior que 99%) como 1,2,3 propanotriol, pertencente a função álcool (nomenclatura IUPAC). O glicerol apresenta entre as fontes renováveis de baixo custo, como um subproduto de elevada disponibilidade da produção de biodiesel, com tendência de aumento e assim uma quantidade anual, sem um mercado direto para absorver essa demanda (CARNEIRO, 2015).

Ao utilizar o glicerol como fonte de carbono, a fermentação pode gerar um rendimento mais baixo ou pode ter uma taxa de crescimento da biomassa menor ao comparar com a utilização de outras fontes de carbono. Entretanto, compensado com a possibilidade de produção de metabólitos de valor agregado, como o ácido cítrico, ácidos graxos poli-insaturados, etanol entre outros (ABAD; TURON, 2012; CARNEIRO, 2015). A figura 6 mostra as vias metabólicas de fermentação do glicerol até a formação das moléculas de glicose e de piruvato. A primeira rota consiste em desidrogenar o glicerol, formando o composto dihidroxiacetona que, após sofrer fosforilação pode ser convertido a piruvato, que possibilita a produção de metabólitos de valor agregado. A segunda rota demonstra a formação da glicose a partir da molécula de glicerol podendo seguir para a glicólise depois de oxidado à dihidroxiacetona fosfatada. (SILVA; MACK; CONTIERO., 2009; CLOMBURG; GONZALEZ, 2013).

Figura 6 - Vias metabólicas de fermentação do glicerol.



Fonte: Adaptado de CARNEIRO (2015) e LOVAGLIO et al.(2015)

3.5 APLICAÇÕES ECONÔMICAS DOS RAMNOLIPÍDEOS

Os biossurfactantes, nos últimos anos, têm atraído grande interesse como uma tecnologia alternativa aos surfactantes sintéticos, principalmente, por apresentarem superior aceitabilidade ecológica e inocuidade à saúde humana. Embora os ramnolipídeos sejam efetivos surfactantes, o custo de produção estimado para estes compostos é ainda muito alto quando comparado aos congêneres de origem química (CAMILIOS-NETO et al., 2011). O crescimento da importância industrial dos biossurfactantes é apresentado nos dados divulgados pela Global Market Insights, Inc (2016), que mostram que, em 2015, o mercado de

biossurfactantes gerou mais de 1,7 bilhões de dólares, e o volume global da indústria deve superar 520 mil toneladas até 2023 com mais de 2,6 bilhões de dólares, alcançando uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,2%, e especificamente para os ramnolipídeos de 7,5%.

Deste modo, aumentar a produtividade, bem como a escala de produção para alcançar a produção industrial de biossurfactantes é urgentemente desejado, e entre os biossurfactantes, os ramnolipídeos são os mais promissores (RANDHAWA; RAHMAN, 2014; LONG et al., 2016). Segundo estimativas, para competir economicamente com os detergentes sintéticos (surfactantes químicos) o custo de produção dos congêneres de origem biológica deve ser reduzido para US \$ 2,11 por litro. Um processo industrial que atinja a maior produção de ramnolipídeos já reportada (um pouco mais de 100 g/L) já seria competitivo. O preço de mercado atual dos ramnolipídeos (vendidos como padrão cromatográfico) é de \$ 227/10 mg (Sigma-aldrich) e US \$ 200/10 mg (AGAE Tecnologias, EUA) (RANDHAWA; RAHMAN, 2014). Por outro lado, a companhia americana Logos Technologies oferece uma linha de surfactantes de origem biológica (NatSurFact®) para uso em higiene pessoal e doméstica com preços a partir de \$ 300,00 dólares americanos por litro de uma solução aquosa de ramnolipídeos de concentração 50 g% (www.natsurfact.com, 2017).

3.6 INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E PROFUNDIDADE DE LEITO NO MEIO DE CULTIVO

A maneira prioritária e mais eficiente para a *Pseudomonas aeruginosa* gerar grande quantidade de energia é através da utilização do oxigênio, porém também pode utilizar nitrato sob condições anaeróbicas com a desnitrificação (HERNANDEZ; DIAS; ROWE, 1991). Microrganismos aeróbios dependem da oferta e disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo, necessitam de oxigênio disponível para sobrevivência, proliferação e produção dos metabólitos desejados (CAMPESI, 2007). Assim a disponibilidade de oxigênio para as células apresenta um grande impacto para o processo (SILVA et al., 2001). Existe uma forte correlação entre a taxa de transferência de oxigênio e a taxa de crescimento do microrganismo. Deste modo, como o oxigênio possui baixíssima solubilidade em água, é preciso oferta-lo

constantemente no meio de cultivo para suprir a demanda celular (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A obtenção de altas concentrações do metabólito desejado, depende da capacidade de transferência de oxigênio para a fase líquida, principalmente quando a concentração celular for elevada, e pode ser interessante submeter as células a um volume constante de meio de cultivo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001), eliminando gastos adicionais de energia com agitação e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor (SCARTAZZINI, 2001).

Dessa forma, é de fundamental importância a transferência de oxigênio em processos fermentativos aeróbicos, para proporcionar dissolução e consequente disponibilidade de oxigênio para microrganismo. Adicionalmente, a obtenção de elevadas concentrações de bioprodutos de interesse, depende totalmente da capacidade de se transferir oxigênio pela fase líquida (AIBA et al., 1973; SILVA et al., 2001).

3.7 FORMAS ALTERNATIVAS DE PRODUÇÃO

Os estudos de produção de ramnolipídeos vem sendo conduzidos predominantemente por fermentação submersa, porém um relevante problema durante a produção vem sendo notado tanto em reatores pilotos como em larga escala quando utilizados para produzir tensoativos. Esses processos de fermentação são mantidos com agitação e aeração forçada, desta forma quando o biossurfactante começa a ser produzido, há grandes quantidades de espuma gerada. Com a presença de espuma a fermentação fica seriamente prejudicada pela perda de biomassa, nutrientes e produtos contidos na espuma que saem do reator, o que diminui os índices de produção ou em casos extremos inviabilizam o processo (LEE; KIM, 2004; YEH et al., 2006; CAMILIOS NETO, MITCHELL, KRIEGER, 2010).

Com a finalidade de combater a formação de espuma na fermentação submersa duas estratégias têm sido utilizadas: a “química”, que envolve a adição de agentes antiespumantes no meio de cultivo ou “mecânica”, que envolve o uso de aparelhos projetados para quebrar a espuma. No entanto, estas estratégias apresentam um elevado custo e não são completamente eficientes, o

que tem contribuído para falta de processos de produção em escala comercial de ramnolipídeos (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Como já abordado, a principal dificuldade na produção em grande escala de biossurfactantes é o custo elevado quando comparado com tensoativos químicos (BORAH et al, 2015). Baseado nessas adversidades, métodos inovadores para produção de ramnolipídeos vem sendo estudados, condições em que a fermentação ocorre de forma estática ajudam a reduzir o custo e ainda evitam a formação de espumas (CAMILIOS-NETO et al., 2017; VIGNOLI et al., 2017), fermentações em estado sólido também vem sendo utilizada para se evitar a formação de espumas e diminuir o custo de produção através de uso de substratos de baixo custo (CAMILIOS-NETO et al., 2011). Os custos operacionais podem ser reduzidos utilizando-se cepas selvagens ou mutantes que apresentem maior habilidade de produção. A possibilidade de obtenção de co-produtos incluindo enzimas também pode ser uma solução atraente para aumentar o lucro (RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

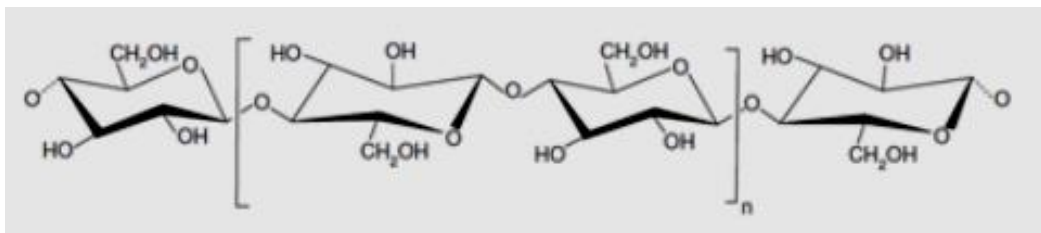
3.8 MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

Em 1886, Brown relatou pela primeira vez a bactéria gram-negativa *Gluconacetobacter xylinus* (atualmente renomeado para *Komagataeibacter xylinus*), ao notar sobre a cultura estática o aparecimento de uma manta gelatinosa formada na superfície do caldo fermentado para a produção de vinagre. A análise da composição da membrana de celulose bacteriana (MCB) mostrou que esta é quimicamente idêntica a celulose vegetal (BROWN, 1886; WATANABE et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2017).

A MCB é branca, cristalina, resistente a ruptura, flexível, semitransparente e permeável à água. Composta de estruturas ultrafinas de celulose que aprisionam grande quantidade de água, com um teor >99% (WATANABE et al., 1993). As MBC são polissacarídeos naturais com composição química formada por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β -(1,4), conhecidas como celobiose (Figura 7) (SAXENA; BROWN JR, 2008; OLIVEIRA et al., 2017). Assemelham-se a uma matriz extracelular natural, exibindo propriedades vantajosas,

e ao contrário da celulose vegetal, são uma forma pura de celulose sem materiais celulares residuais, como a hemicelulose, pectina, lignina e proteínas (OLYVEIRA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017).

Figura 7 – Fórmula estrutural da celulose com suas ligações glicosídicas β -(1-4). Entre colchetes destaca-se a celobiose, unidade básica de repetição na cadeia.



Fonte: SAXENA; BROWN JR (2008)

Estas características das MCB sugerem que utilização pode ser adequada para aplicações em culturas de célula, que são amplamente utilizadas para a produção de várias substâncias como ferramenta para pesquisa em diferentes áreas, como na biologia molecular (BRANDLY *et al.*, 1987; WATANABE *et al.*, 1993; ARAUJO; TISCHER; CAMILIOS-NETO, 2015; FARIA-TISCHER *et al.*, 2016).

Dado o grande potencial de mercado dos surfactantes de origem biológica e o conjunto de características positivas apresentadas pelos ramnolipídeos, muita atenção deverá ser dada para obtenção industrial deste composto nos próximos anos. Assim, esforços para o desenvolvimento de processos de menor custo e o aumento na escala de processo são necessários para atender às futuras previsões do mercado de biosurfactantes (RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Neste tópico são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho e as metodologias empregadas. São descritas as técnicas utilizadas para a condução e para o acompanhamento dos cultivos, realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia (UEL).

Na figura 8 é apresentado um fluxograma com a metodologia, a lista com os principais produtos químicos utilizados na realização dos experimentos é apresentada na Tabela 5.

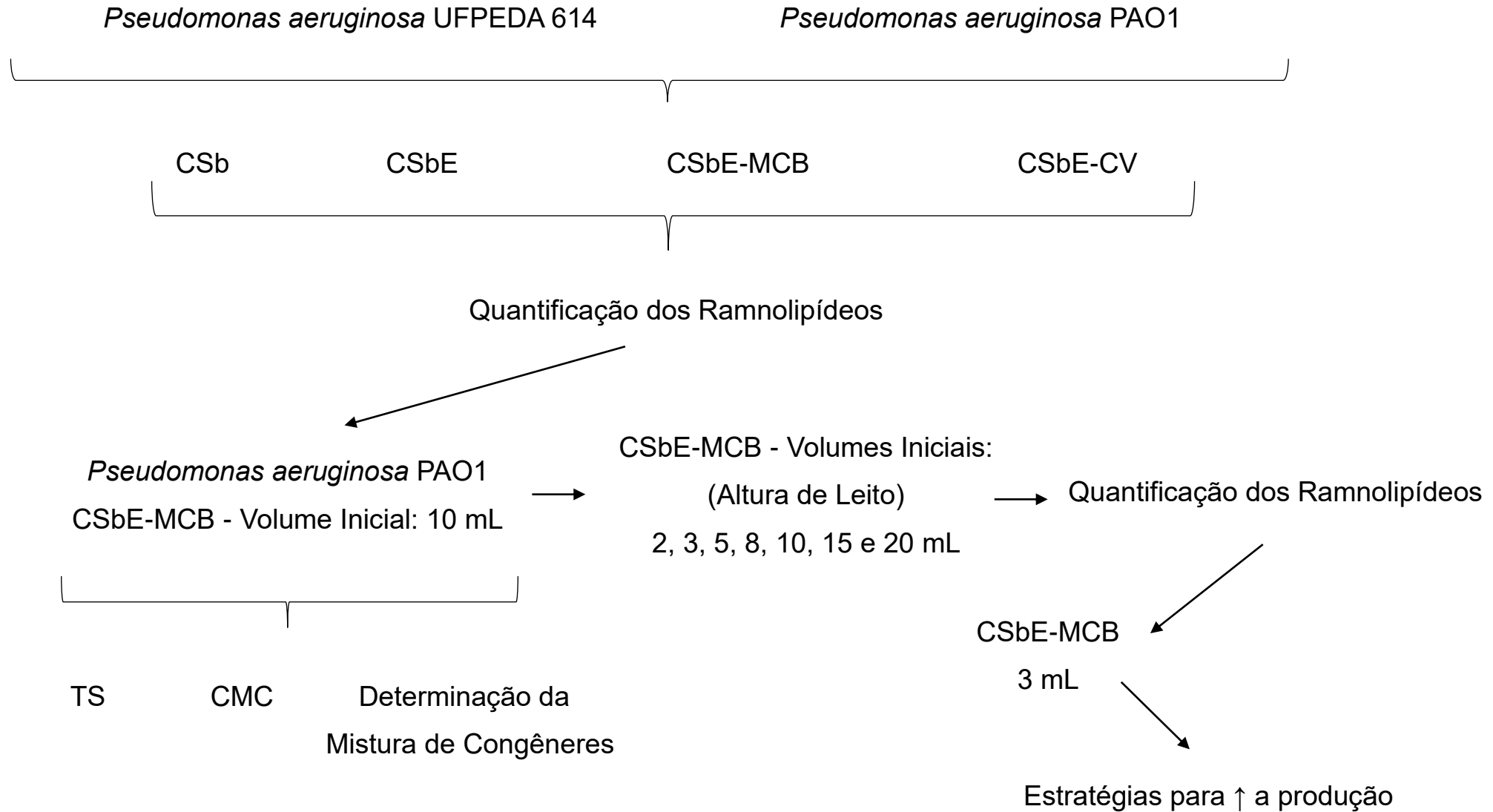
Tabela 5 – Materiais utilizados na realização dos experimentos.

Item utilizado	Fabricante
Triptona	Acumedia
Extrato de Levedura	Reatec
NaCl	Synth
Ágar	Himedia
KH ₂ PO ₄	Nuclear
K ₂ HPO ₄	Nuclear
MgSO ₄ .7H ₂ O	Nuclear
(NH ₄)SO ₄	Biotec
Glicerol	Vetec
Clorofórmio	Synth
Metanol	Synth

4.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, isolada originalmente na Austrália, a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). PAO1 é a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais, apresenta o genoma sequenciado, publicado (STOVER et al., 2000) e muito bem anotado. Também foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, originalmente isolada de uma planta

Figura 8 - Fluxograma da metodologia.



petroquímica em Canto do Amaro, Rio Grande do Norte, gentilmente cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. Ambas as cepas foram mantidas em meio líquido Luria-Bertani (LB) (composição por litro: 10 g triptona, 5 g extrato de levedura e 10 g de NaCl) adicionado de glicerol (20 %, v/v) e estocada a -80 °C.

4.1.2 Preparo do Pré-Inóculo

Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculados com 3-5 colônias de PAO1 proveniente de placas de meio LA [LB adicionados de 1,5 % (m/v) de ágar] e incubados por 12-16 h a 37 °C/200 rpm. Os inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2 % (v/v) e incubados, em agitador orbital, a 37 °C por 5-6 h sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano durante o preparo do inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (D.O. 600 nm), e utilizado como inóculo quando a D.O. 600 nm encontrar-se entre 0,6 e 0,8.

4.1.3 Cultivos Submersos (CSb)

Os ensaios de CSb foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio cultivo (MMG3), composto de sais (contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) acrescentado de glicerol (3% v/v). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2 % v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital a 37 °C/200 rpm.

4.1.4 Cultivos Submersos Estáticos (CSbE)

Os ensaios de CSbE foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL, contendo 3-17 mL de meio MMG3. Os meios foram inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2 % (v/v) e incubados a 37 °C.

4.1.5 Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana (CSbE-MCB)

Os ensaios de CSbE-MCB foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL, contendo 1 membrana de celulose bacteriana úmida, obtida como descrito (GOELZER et al., 2009). As membranas de celulose bacteriana apresentam aproximadamente 80 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. As membranas foram esterilizadas por 20 min, a 121 °C, resfriadas e inoculadas em uma proporção de 2 % de volume de inóculo em volume de meio MMG3. Os volumes de meio utilizados por membrana variaram de 1 a 20 mL.

4.1.6 Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Celulose Vegetal (CSbE-CV)

Os ensaios de CSbE-CV foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL, contendo de 1 a 3 membrana de celulose vegetal. As membranas de celulose vegetal (papel germitex) apresentam aproximadamente 80 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. As membranas foram esterilizadas por 20 min, a 121 °C, resfriadas e inoculadas em uma proporção de 2 % de volume de inóculo em volume de meio MMG3. Os volumes de meio utilizado por membrana variaram de 3 a 10 mL.

4.1.7 Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana com Óleo de Soja (CSbE-MCB_1%OS)

Os ensaios de CSbE-MCB_1%OS foram realizados como descrito no item 4.1.5, acrescentado de 1% (v/v) de óleo de soja.

4.1.8 Cultivos Submersos Estáticos em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana com Extrato Aquoso de Torta de Milho (CSbE-MCB_EA-TM)

Os ensaios de CSbE-MCB_1%EA-TM foram realizados como descrito no item 4.1.5, acrescentados de extrato aquoso de torta de milho (1:1 v/v), acrescentados com glicerol em diferentes proporções, sendo elas 3%, 6% e 9%. A

torta de milho utilizada no presente trabalho, foi gentilmente cedida pelo Moinho Caramuru situado no município de Apucarana, estado do Paraná. Este subproduto foi inicialmente triturado em moinho de bancada e tamisada em 20 mesh (8,41 mm) para maior homogeneização. Em seguida realizada extração aquosa em autoclave (121 °C/ 20 minutos), em uma proporção de 10:60 (m/v) de água para torta de milho, em seguida, centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante (extrato aquoso da torta de milho).

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Determinação do Crescimento Bacteriano do Pré-Inóculo

O crescimento bacteriano foi acompanhado utilizando o espectrofotômetro Genesys 6 UV-Vis, pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm.

4.2.2 Extração dos Ramnolipídeos

Os ensaios de CSbE-MCB foram interrompidos, após 9 dias, e submetidos à extração dos ramnolipídeos com água destilada em agitador orbital a 200 rpm, por 30 minutos e em temperatura ambiente. Os extratos resultantes, assim como as CSb e CSbE foram centrifugados a 2.500 g a 25 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes livre de células foram submetidos à extração com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:1) e os ramnolipídeos recuperados na fração orgânica. Os ramnolipídeos recuperados foram solubilizados em água destilada.

4.2.3 Quantificação dos Ramnolipídeos

A quantificação indireta dos ramnolipídeos foi feita pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al. 1956) utilizando uma curva padrão com ramnose. Foi utilizada a fração orgânica solubilizada em água item 4.2.2.

4.2.4 Determinação da Tensão Superficial (TS)

A medida da tensão superficial foi realizada, dos ramnolipídeos recuperados na fração orgânica solubilizada em água (item 4.2.2), utilizando-se um tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12 (Hamburgo, Alemanha). As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de Du Nouy. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. A força adicional exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido se rompe dá a medida da tensão superficial (CAMILIOS NETO et al., 2009). As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises, medindo-se a tensão superficial da água destilada.

4.2.5 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A determinação da CMC, segundo técnica descrita por Sheppard e Mulligan (1987). Foi realizada medindo-se a tensão superficial através de diluições sucessivas (com água destilada) dos ramnolipídeos recuperados na fração orgânica solubilizada em água destilada (item 4.2.2). Dessa forma, foi construído um gráfico plotando-se a tensão superficial (item 4.2.4) medida contra a concentração de ramnolipídeos, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. As medidas de tensão superficial foram determinadas até que os valores obtidos se aproximassem da tensão superficial da água destilada (70-72 mN/m).

4.2.6 Determinação do Índice de Emulsificação (E)

O índice de emulsificação (E) dos ramnolipídeos recuperados na fração orgânica solubilizada em água destilada (item 4.2.2). Foi determinado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio com tampa de rosca, foram distribuídos 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, tolueno, gasolina e diesel), posteriormente, foi adicionado 4 mL de solução aquosa de ramnolipídeos. Cada tubo foi então submetido à agitação em

vórtex (rotação máxima) por 2 minutos. O índice (E) foi determinado de acordo com a equação 1. As medidas foram realizadas após 24 h e 720 h.

$$E = \frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)} \times 100}{\text{altura total do líquido (cm)}} \quad (\text{Equação 1})$$

4.2.7 Determinação da Mistura de Congêneres de Ramnolipídeos Produzidos por Submerso Estático em Suporte de Membrana de Celulose Bacteriana Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-QTOF)

As amostras foram analisadas em Espectrômetro de Massas LC-QTOF, em modo negativo, marca Bruker modelo Compact acoplado a Cromatógrafo Líquido Shimadzu Prominence UFLC utilizando coluna Michron Magic-C18, 150 mm X 2,00 mm, 5mm. As amostras foram extraídas como descrito no item 4.2.2 e solubilizadas em metanol. As condições de análise foram: energia do capilar de 2,45 kV, e energia do cone de 43 V. Para aquisição dos espectros foi utilizada uma faixa de m/z de 200 a 800. As abundâncias relativas (%) da mistura de ramnolipídeos foram calculadas pela integração da intensidade relativa de seus correspondentes íons pseudomoleculares.

4.2.8 Cromatografia Líquida em Camada Delgada (CCD)

Os ramnolipídeos recuperados na fração orgânica solubilizada em metanol foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) sobre sílica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄, 20x20cm), sendo o eluente composto por uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético (65:15:2). A presença dos ramnolipídeos foi identificada com a utilização de revelador específico para carboidrato, orcinol aquecido a 100 °C por 5 minutos (SKISPISKI, 1975).

4.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram realizadas análises de de varredura nas Membranas de Celulose Bacteriana colonizadas por PAO1, através de microscopia eletrônica de varredura em microscópio Philips Quanta 200 (Centro de Microscopia da UEL). Para análise, uma pequena porção de cada membrana foi presa em um suporte com auxílio de fita de carbono e recobertas de carbono e ouro.

4.2.10 Análise de volume residual

Foi realizado uma análise do volume de meio de cultivo do sistema a fim de observar a perda/velocidade de ressecamento média entre os dias 6 e 8 da cinética de produção de ramnolipídeos por cultivo submerso estativo em suporte de membrana de celulose bacteriana.

4.2.11 Quantificação da Biomassa

A biomassa obtida após a centrifugação foi ressuspensa em solução salina (0,9 % m/v), distribuiu-se em alíquotas de 1 mL em tubos previamente tarados. Estes foram levados à estufa (70 °C), até atingir peso constante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM SUPORTE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

Experimentos preliminares de produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos utilizando membranas de celulose bacteriana (CSbE-MCB) apresentaram resultados muito promissores (Tabela 6). Quando comparados aos outros dois processos de produção de ramnolipídeos [i.e., cultivos submersos (CSb) e cultivos submersos estáticos (CSbE)], a utilização de membrana de celulose bacteriana apresentou valores de produção até 4 vezes superior, indicando a viabilidade do sistema para qualquer umas das cepas testadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação da produção de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 (30 °C) e PAO1 (37 °C) por cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana, cultivos submersos e cultivos submersos estáticos, por um período de 9 dias.

Cultivos	Ramnolipídeos (g/L) ^a	Ramnolipídeos (g/L) ^a
	UFPEDA 614	PAO1
CSbE-MCB	3,7±0,11	3,7±0,12
CSbE	1,4±0,04	2,5±0,04
CSb	0,8±0,04	2,9±0,16

^a Concentrações de ramnolipídeos são médias de triplicatas ±desvio padrão. A sigla CSbE-MCB indica cultivo submerso estático com suporte de membrana de celulose bacteriana, CSbE indica cultivo submerso estático e CSb indica cultivo submerso com rotação de 200 rpm.

PAO1 é a cepa referência de *Pseudomonas aeruginosa* mundialmente utilizada em estudos laboratoriais, adicionalmente apresenta o genoma sequenciado (STOVER et al., 2000) e muito bem anotado. Os experimentos deste ponto em diante foram conduzidos com esta cepa e à temperatura de 37 °C, já que esta é a temperatura recomendada para esta cepa. A utilização de PAO1 nos possibilitará comparar nossos resultados com um grande número de trabalhos encontrados na literatura científica, incluindo aqueles que tratam da patogenicidade

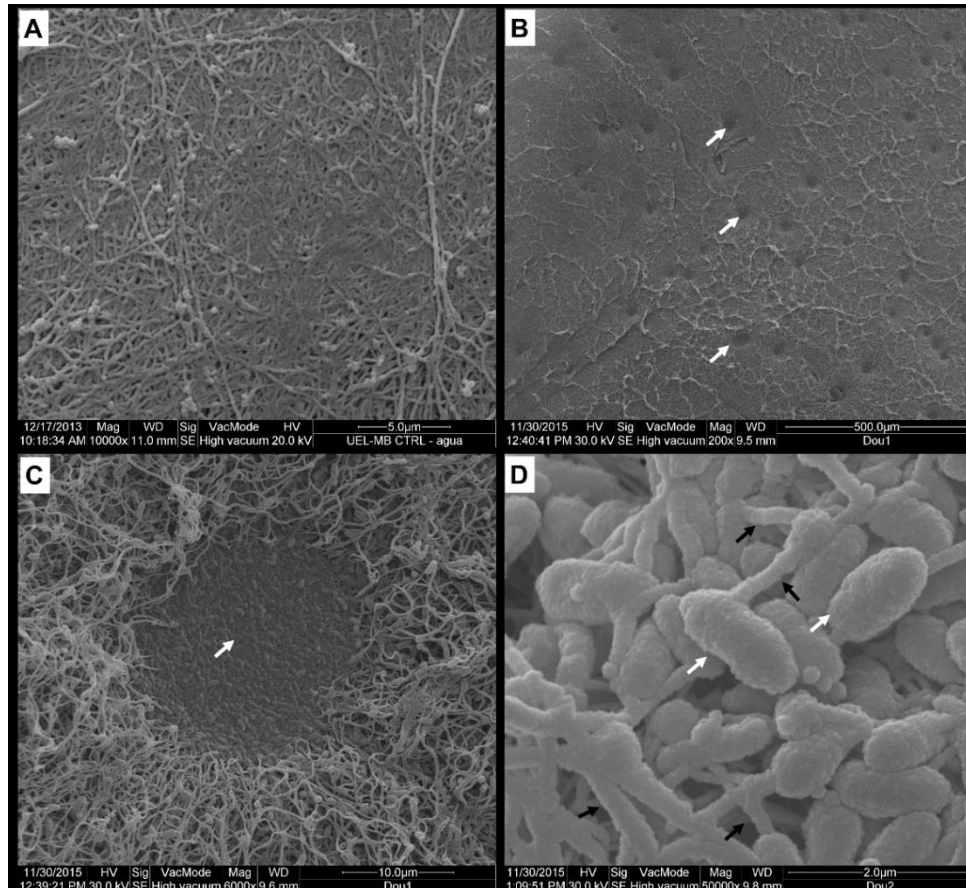
desta bactéria (note que os ramnolipídeos também estão relacionados com a virulência desta bactéria).

5.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ADESÃO CELULAR NA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Figura 9 mostra micrografias eletrônicas de varredura de MCB colonizadas por PAO1 e uma MCB controle (não colonizada). CSbE-MCB de 48 horas e MCB-controle foram submetidos a análises de microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 9-A podem ser vistas as fibras de celulose de uma MCB (controle) submetida ao mesmo tratamento das membranas utilizadas no processo de produção de ramnolipídeos (*i.e.*, esterilização por 20 min, a 121 °C e 1 ATM). Enquanto, 9-B, -C e -D mostram MCB utilizadas no processo de produção de ramnolipídeos após 48 h de cultivo. As setas em 9-B indicam "depressões" na MCB características de pontos de colonização. Em 9-C pode ser visto um dos pontos de colonização mostrado com maior magnitude de aumento. Finalmente, em 9-D é possível, em uma magnitude de aumento ainda maior (50.000x), visualizar *Pseudomonas aeruginosa* que estão em maior contato com a MCB e se aderiram fortemente nas fibras de celulose (setas brancas indicam células bacterianas enquanto as setas pretas indicam fibras de celulose).

Baseados nos resultados obtidos com a microscopia eletrônica de varredura não é possível inferir nenhum tipo de conclusão acerca da possível formação de biofilme de PAO1 sobre as MCB. No entanto, pode-se inferir que a adesão das células de PAO1 às MCB é fraca e que provavelmente os procedimentos de preparado das amostras para microscopia sejam suficientes para desprender a maior parte das células. Vale lembrar que os ramnolipídeos são conhecidos como agentes desagregantes de biofilme (ZHENG, et al., 2017), assim seria esperado que condições que propiciem altos níveis de produção de ramnolipídeos propiciem baixa formação de biofilme.

Figura 9 - Micrografias eletrônicas de varredura de membranas de celulose bacterianas colonizadas ou não por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.



(A) Controle (aumento de 10.000x), fibras de celulose de uma MCB submetida à esterilização por 20 min, a 121°C e 1ATM; (B) pontos de colonização de PAO1 com 48 horas de cultivo (aumento de 200x), setas indicam depressões características de ponto de colonização de PAO1; (C) ponto de colonização de PAO1 com 48 horas de cultivo (aumento de 6.000x); (D) PAO1 fortemente aderidas às fibras de celulose bacteriana (aumento de 50.000x), setas brancas indicam células de PAO1 enquanto as setas pretas indicam fibras de celulose.

Através da PAO1 transformada com plasmídeo que expressa proteína fluorescente verde (GFP) (ver sugestões para experimentos futuros, item 7.3), é possível realizar a determinação da cinética de adesão e possível formação de biofilme, e a adesão sobre as MCB acompanhada por microscopia de fluorescência e por microscopia confocal utilizando sistema de filtros FITC (emissão 525 nm e excitação 490 nm). A possível visualização de preparados “à fresco” pode facilitar a visualização de células não fortemente aderidas ou mesmo biofilmes também não fortemente aderidos.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DOS RAMNOLÍPIEOS PRODUZIDOS POR CULTIVOS SUBMERSOS ESTÁTICOS COM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

Neste tópico serão descritas as caracterizações físico-químicas como a determinação da tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC), a determinação do índice de emulsificação, e as caracterizações estruturais, como cromatografia em camada delgada (CCD) e a determinação de congêneres de ramnolípídeos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-QTOF) do extrato bruto das amostras de ramnolípídeos produzida por cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana.

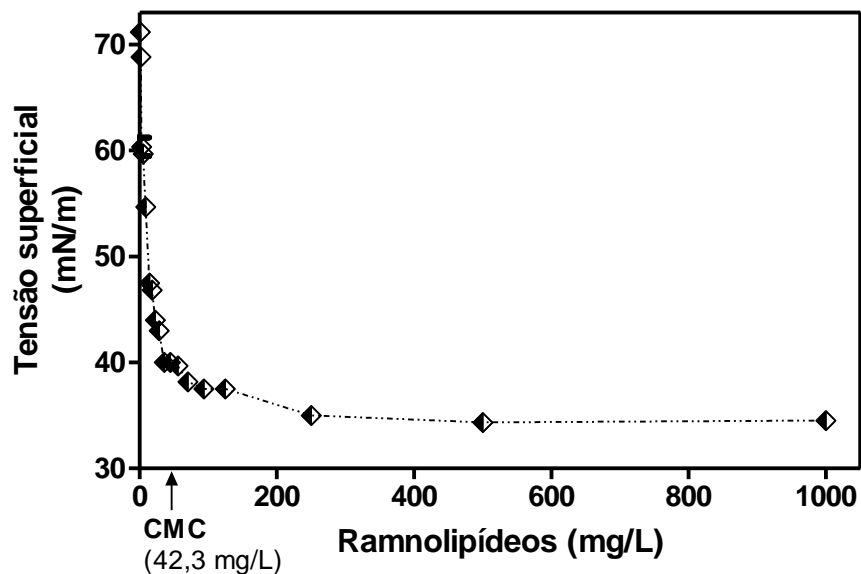
5.3.1 Determinação da Tensão Superficial (TS) e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC dos ramnolípídeos obtidos pelo presente processo (CSbE-MCB) foi determinada em função da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas de solução aquosa do extrato orgânico concentrado de ramnolípídeos (Gráfico 1). Construindo-se um gráfico da tensão superficial medida contra a concentração de ramnolípídeos, obteve-se graficamente a CMC, que corresponde ao ponto central de inflexão da curva. Observa-se que a tensão superficial da água diminuiu de 72 mN/m para aproximadamente 32 mN/m quando se empregou uma concentração de biossurfactante de 42,3 mg/L. Maiores concentrações de biossurfactante não apresentaram grande influência na variação da tensão superficial do meio, dessa forma o valor de CMC do biossurfactante em meio aquoso corresponde a 42,3 mg/L (Gráfico 1). A concentração micelar crítica (CMC) é definida como a concentração mínima de surfactante em solução necessária para formação de micelas, é um importante parâmetro para avaliação da eficiência de surfactantes, quanto mais eficiente for este, menor será a CMC.

Em linhas gerais, a mistura de ramnolípídeos obtidas no presente processo apresentou uma CMC que se enquadra com os melhores resultados de CMC para ramnolípídeos encontrados na literatura científica. Em que as *Pseudomonas* são capazes de reduzir a tensão superficial da água a valores entre 25 a 30 mN, apresentando sua CMC entre 10 e 200 mg/L, dependendo das

diferentes fontes microbianas, das condições de pH e da salinidade do meio. Entretanto, os ramnolipídeos não são os biossurfactantes mais eficazes para uma maior redução da tensão superficial ou menor CMC, se destacam por apresentarem alta atividade emulsificante e uma pequena atividade antimicrobiana (MULLIGAN, 2005; (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011).

Gráfico 1 - Determinação da concentração micelar crítica (CMC) a partir de diluições seriadas de solução aquosa de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana.



Valores de médias obtidas a partir de triplicatas.

5.3.2 Determinação do Índice de Emulsificação (E)

O índice de emulsificação (E) expressa a capacidade dos biossurfactantes emulsificarem compostos hidrofóbicos, classificando-se como uma das formas utilizadas para caracterizar o poder emulsificante de um surfactante. Um critério obedecido para ser considerado como bom emulsificante é a capacidade de formar emulsão com o hidrocarboneto e essa se manter acima de 50 % por 24 horas ou mais (WILLUMSEN; KARLON, 1997).

Soluções aquosas da mistura de ramnolipídeos, com concentrações de 0,1 e 0,05 g/%, foram utilizadas para avaliação do IE de 24 horas (E_{24}) (Figura 10

e Gráfico 2). Os ensaios apresentaram um excelente poder de emulsificação, em que a mistura de ramnolípídeos, obtida neste processo de produção, mostrou maior poder emulsificante para o querosene. O E_{24} para o querosene foi superior a 80 % para a concentração de 0,1 g/%, e uma leve diminuição do E_{24} foi observada na concentração de ramnolípídeos de 0,05 g/%. O E_{24} para óleo diesel foi de aproximadamente 65%, para a solução mais concentrada, enquanto que a solução menos concentrada não foi capaz de formar emulsão. O E_{24} para hexano ficou um aparentemente em 60% para ambas as concentrações do biossurfactante. Enquanto que os menores E_{24} foram para gasolina, próximo de 50 % para a concentração de 0,1 g/% e aproximadamente 45% para a concentração de 0,05 g/%.

Figura 10 – Teste de emulsificação para hexano, querosene, gasolina e diesel, nas concentrações de 0,1 g/% e 0,05 g/%.

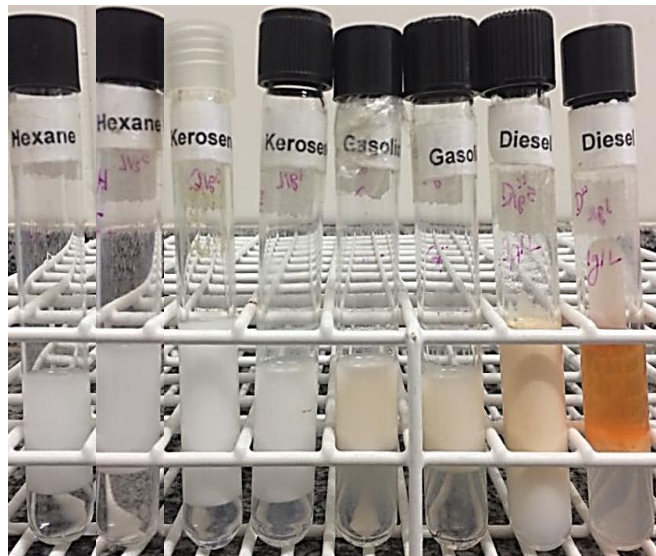
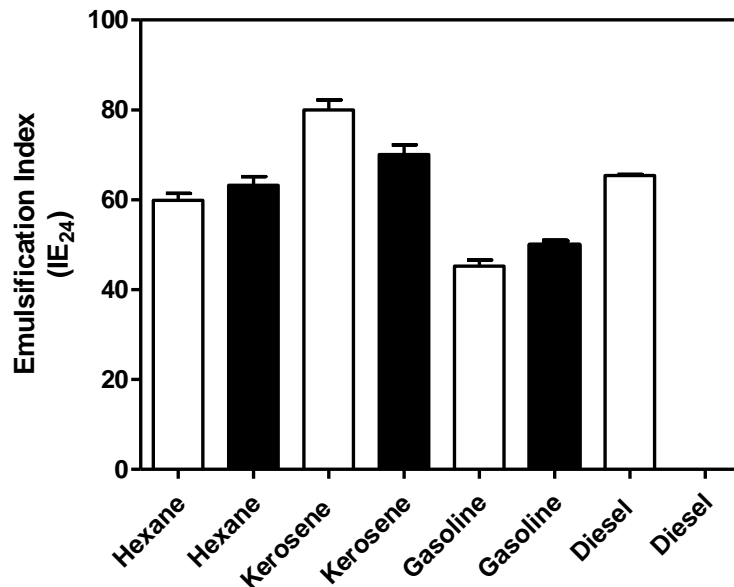


Gráfico 2- Índice de emulsificação (E) frente a diferentes hidrocarbonetos, de ramnolípídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana.



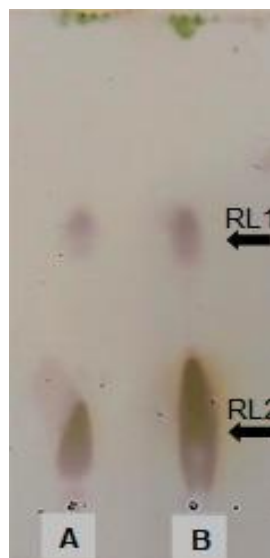
Barras brancas concentração de ramnolípídeos 0,1 g e barras pretas concentração de ramnolípídeos 0,05 g. Valores de médias obtidas a partir de triplicatas \pm desvio padrão.

Diferentes cepas de *Pseudomonas* produzem misturas de ramnolípídeos que apresentaram índice de emulsificação entre 12 e 64 % (HABA et al., 2000). Misturas de ramnolípídeos produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 apresentaram resultados semelhantes com E₂₄ de 83 % para gasolina, 73 % para óleo diesel e 44 % para querosene, por cultivos em estado sólido (MEIRA 2007; CAMILIOS NETO et al., 2009) e cultivos submersos (MONTEIRO et al., 2007), ambos utilizando glicerol como fonte de carbono. Índices de emulsificação (E) entre 70 % e 80 % para o querosene com ramnolípídeos produzidos a partir de óleo de semente de uva e óleo de girassol (WEI et al., 2005), enquanto 63,5 % a partir de ramnolípídeos obtidos por cultivos submersos utilizando glicerol como fonte de carbono (SOUSA et al., 2014). A mistura de ramnolípídeos obtidas por CSbE-MCB apresentou bom poder emulsificante e encontra-se dentro a média dos resultados obtidos na literatura O presente resultado sugere que os ramnolípídeos obtidos por esta tecnologia fermentativa pode substituir os obtidos pelos processos usuais sem nenhuma perda da propriedade tensoativa.

5.3.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A presença dos dois componentes majoritários, mono-ramnolipídeos (RL1) e di-ramnolipídeos (RL2) produzidos através de CSbE-MCB foram visualizados por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 11). O extrato bruto de misturas de ramnolipídeos obtido de CSbE-MCB com volume inicial de meio de 10 mL podem ser visualizados através da intensidade dos *spots* obtidos na CCD (Figura 11). A maior proporção de RL2 (spots mais próximos da linha de aplicação), foi confirmada através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-QTOF) (Figura 12, Figura 13 e Tabela 7).

Figura 11 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana.



(A) Extrato bruto contendo mistura de mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos. (B) extrato bruto contendo ramnolipídeos de cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana com volume inicial de 10 mL. RL1, mono-ramnolipídeos e RL2 di-ramnolipídeos.

5.3.4 Determinação da Mistura de Congêneres de Ramnolipídeos Produzidos por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-QTOF)

Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são uma mistura de homólogos de mono-ramnolipídeos e de di-ramnolipídeos. Com o intuito de se determinar quais os homólogos são produzidos no presente processo fez-se a determinação estrutural e a quantificação da abundância relativa de cada congêneres por espectrometria de massa. O processo avaliado proporcionou a produção de uma mistura de homólogos com maior abundância dos homólogos de di-ramnolipídeos (Tabela 7). Assim, a produção de ramnolipídeos por CSbE-MCB promove uma maior obtenção de congêneres de ramnolipídeos com duas moléculas de ramnose, o que pode ser uma grande vantagem na obtenção de estrutura única de maior abundância, neste caso Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (Figuras 12 e 13 e Tabela 7). A obtenção de uma molécula única é requerida para aplicações mais refinadas como, por exemplo, o uso como potencial medicamento. Assim, um processo que apresente uma maior abundância de um dos congêneres é de grande interesse. As estruturas dos principais congêneres obtidos no processo de produção (CSbE-MCB) são mostradas na Figura 13.

Figura 12 - Perfis de massa obtidos da mistura de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana.

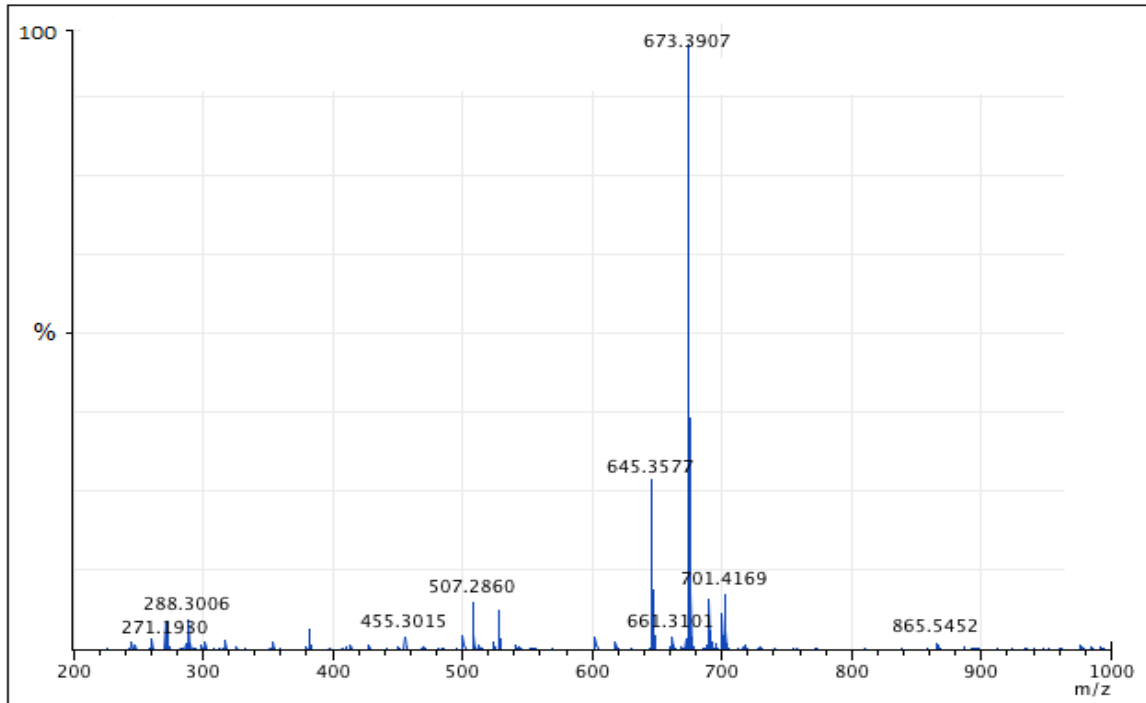


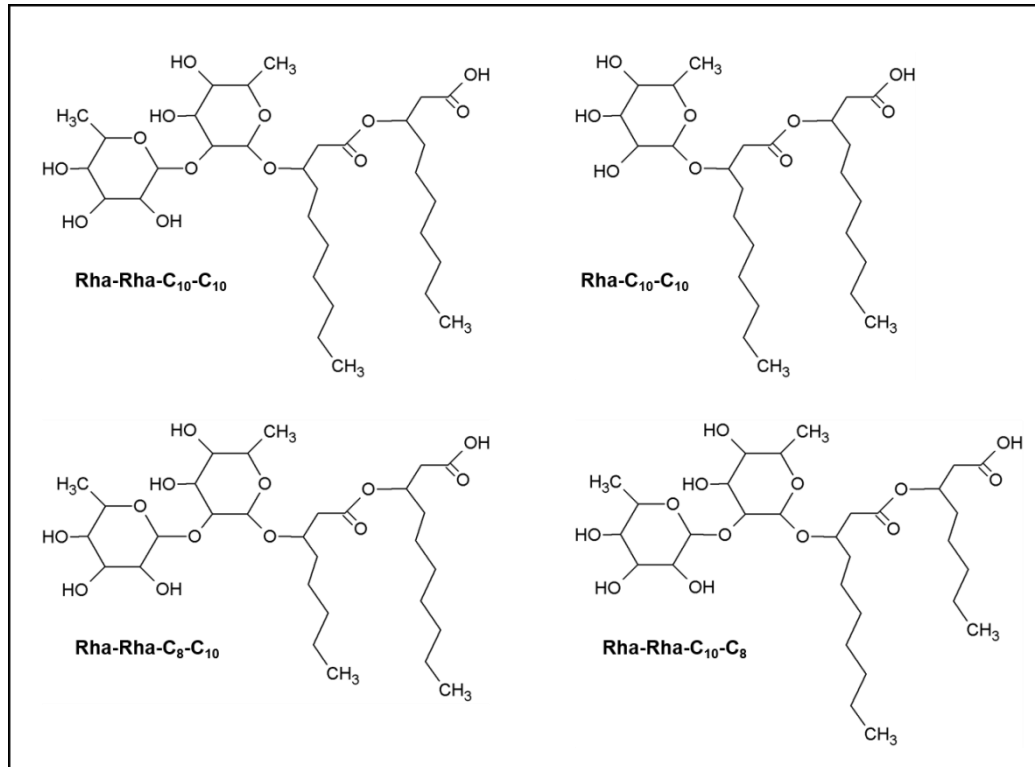
Tabela 7 - Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de membranas de celulose bacteriana.

Homólogos	[M+Na ⁺] ^a	Massa Molar	Porcentagem Relativa	Porcentagem Total
Mono-ramnolipídeos				4,4
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	527	504	4,4	
Di-ramnolipídeos				95,6
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀			66,8	
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	645 ^b	622	18,7	
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈				
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	699 ^b	676	4,0	
Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀				
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	701 ^b	678	6,1	
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀				

^a Aduto – picos encontrados espectro de massa Figura 9

^b Isômeros

Figura 13 - Estruturas dos principais congêneres de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de celulose bacteriana.

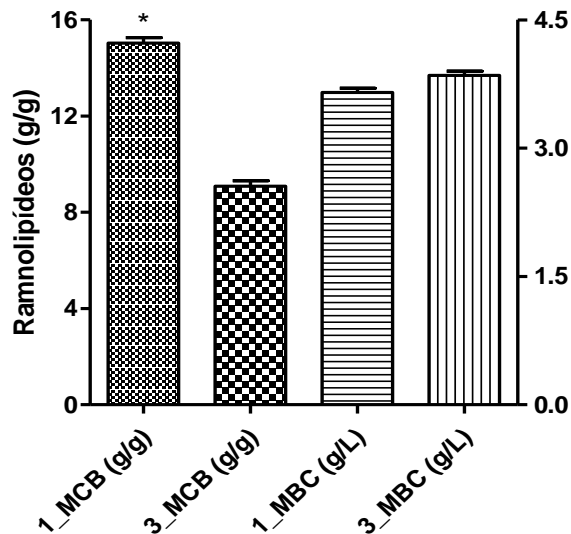


A predominância de RL2 sobre seu congêneres RL1 tem sido apresentada por diversos autores a partir de diferentes linhagens de *Pseudomonas* sp. SOUSA et al., (2014) apresenta como compostos majoritários estruturas homólogas correspondentes a Rha-Rha-C₁₀-C₈ ou Rha-Rha-C₈-C₁₀, e RhaRha-C₁₀-C₁₂ ou Rha-Rha-C₁₂-C₁₀. 7, e compostos minoritários correspondente às estruturas Rha-C₁₀-C₈ ou Rha-C₈-C₁₀ e Rha-C₁₀-C₁₂ ou Rha-C₁₂-C₁₀. Em APARNA et al., (2012) também foi obtido em maioria de RL2 com Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, seguidos por Rha-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂. BHARALI e KONWAR et al., (2011) demonstraram maior obtenção de Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ e depois Rha-C₁₀-C₁₀.

5.4 QUANTIDADE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA E RELAÇÃO COM A BIOMASSA E A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

Como mencionado no item anterior, o padrão de adesão das células de PAO1 sobre às MCB é muito baixo, sendo que a maior parte das células estão fracamente aderidas ou mesmo não aderidas e são facilmente retiradas junto com a extração aquosa dos ramnolipídeos (item 4.2.2) e recuperadas por centrifugação. Desta forma, foi possível quantificar por gravimetria a biomassa produzida por CSbE-MCB. Experimentos realizados com presença de 1 ou 3 MCB foram realizados no intuito de avaliar se a área de adesão influenciaria o crescimento bacteriano e a produção de ramnolipídeos. A presença de 3 MCB aumentou a quantidade de biomassa, entretanto, a maior área de superfície não apresentou diferença significativa na produção de ramnolipídeos (Gráfico 3).

Gráfico 3- Avaliação da relação da quantidade de Membrana de Celulose Bacteriana e relação com a biomassa.



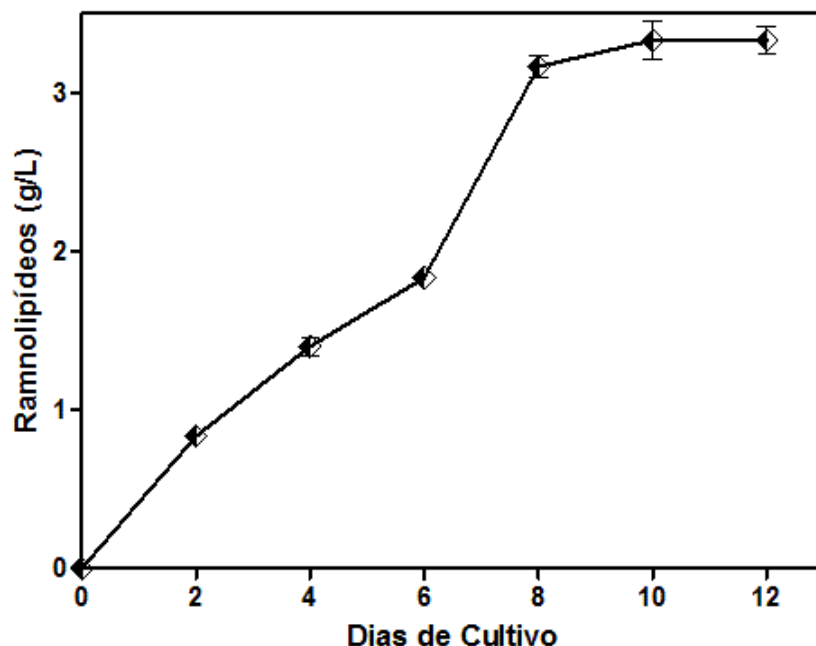
1_MCB (g/g) e 3_MCB (g/g), presença de 1 e 3 membranas de celulose bacteriana em cultivo submerso estático, respectivamente, concentração de ramnolipídeos expressa em gramas por gramas de células. 1_MCB (g/L) e 3_MCB (g/L) presença de 1 e 3 membranas de celulose bacteriana em cultivo submerso estático, respectivamente, concentração de ramnolipídeos expressa em gramas por litros de meio de cultivo. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. * Diferença estatisticamente significativa em t-teste [1_MCB (g/g) vs 3_MCB (g/g)], p-valor <0,05.

Uma vez que não houve aumento de produção com aumento da superfície de adesão das MCB, os próximos experimentos continuaram utilizando apenas uma membrana por Erlenmeyer.

5.5 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1 EM CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO COM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

A cinética de produção de ramnolípídeos por CSbE-MCB, apresentou um incremento linear de produção nos primeiros seis dias de cultivo. Adicionalmente, um incremento significativo na produtividade pôde ser visto entre os dias 6 e 8 de cultivo, enquanto que entre 8 a 12 dias de cultivo a produção atinge um platô (Gráfico 4). Portanto, a cinética de produção de ramnolípídeos sugere que nas condições do presente processo a produção máxima é obtida a partir de 8 dias de cultivo.

Gráfico 4 - Cinética de produção de ramnolípídeos por cultivos submersos estáticos em suporte de celulose bacteriana utilizando 10 mL de volume inicial de meio.



Valores de médias obtidas a partir de triplicatas \pm desvio padrão.

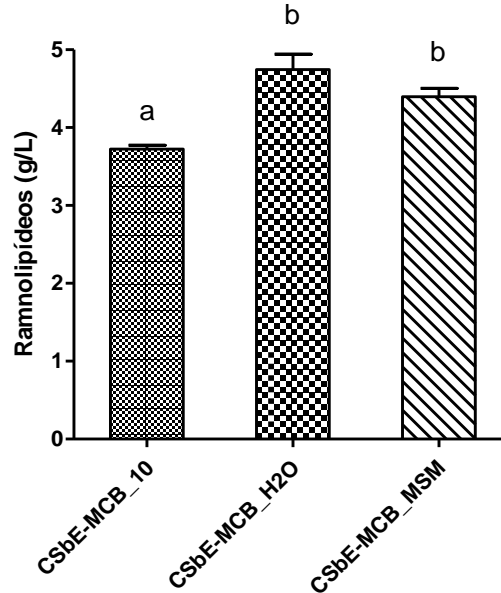
Baseados na hipótese que a melhor produtividade obtida, entre os dias de 6 a 8, pudesse estar relacionada a uma altura ótima de leito os próximos experimentos tiveram como objetivo avaliar a altura de leito de cultivo.

5.6 ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DE PROFUNDIDADE DO LEITO DE CULTIVO DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO COM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

5.6.1 Adição de Água Destilada ou Meio de Cultivo Durante a Fase Exponencial de Produção em Cultivo Submerso Estático com Membrana de Celulose Bacteriana

Uma análise do volume residual de meio cultivo do sistema (item 4.5) revelou que a velocidade de ressecamento média entre os dias 6 a 8 (Gráfico 4) foi de 1 mL/dia. Assim, o próximo bloco de experimentos teve como objetivo a manutenção da altura de leito entre os dias 7 a 9 iguais aos obtidos com 6 dias de cultivo, através da adição diária ao sistema de 1 mL de água destilada ou de meio de cultivo (MMG3). Esta estratégia promoveu um incremento significativo na produção de ramnolipídeos, sobretudo através da adição de água (Gráfico 5), o que sugere que o efeito da manutenção de altura de leito promoveu incrementos na obtenção do ramnolipídeos, mas não alterou a taxa de conversão de substrato em produto.

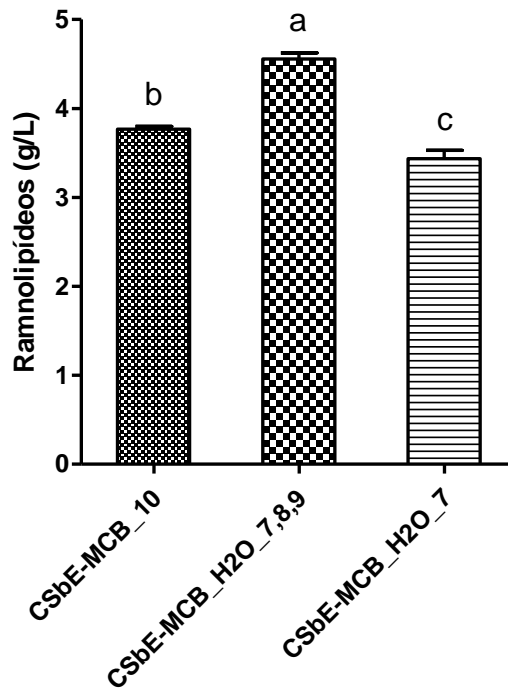
Gráfico 5 - Avaliação da adição de água ou meio de cultivo nos cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana.



CSbE_MCB_10, cultivos sem adição de água ou meio e com volume inicial de 10 mL; CSbE_MCB_H2O e CSbE_MCB_MSM, adição de água ou de meio, respectivamente. 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.

Uma vez que, apenas a adição de água mostrou-se significativa, novos experimentos foram feitos utilizando esta estratégia. Um novo bloco de experimentos foi feito com a adição 1 mL nos dias 7, 8 e 9 (CSbE-MCB_H2O_7,8,9) (mesma estratégia do Gráfico 5) e também com a adição direta de 3 mL no sétimo dia de cultivo (CSbE_MCB_H2O_7) (Gráfico 6). A adição direta de 3 mL de água em uma única vez proporcionou uma diminuição significativa na produção de ramnolipídeos. Uma possível explicação desta queda deve estar relacionada com a maior alteração do volume de leite ocasionado pela adição total em um único ponto de 3 mL de água. Por outro lado, assim como observado na Gráfico 6 a adição fracionada dos 3 mL de água levou a uma maior produção de ramnolipídeos.

Gráfico 6 - Avaliação da adição de água nos cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana.

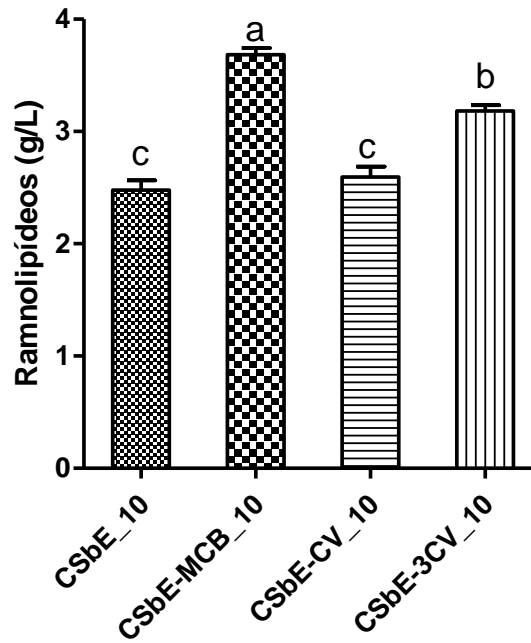


CSbE_MCB_10, cultivos sem adição de água ou meio e com volume inicial de 10 mL; CSbE_MCB_H2O_7 e CSbE_MCB_H2O_7,8,9, acréscimo de 3 mL de água no 7º dia e 1 mL nos 7º, 8º e 9º dias, respectivamente. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,01.

5.6.2 Cultivo Submerso Estático com Suporte de Celulose Vegetal (CSbE-CV)

Os resultados obtidos até o momento sugerem uma grande influência da altura do leito na produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos. Note que a presença de membrana diminui a altura da coluna de meio sobre as bactérias que crescem nesta. Assim, com o intuito de se avaliar a relação do efeito da presença da membrana de celulose com o incremento da produção de ramnolipídeos e o efeito da altura do leito, um novo bloco de experimentos foi realizado. Comparações de cultivos submersos na presença [(i) Csbe-MCB] e ausência [(ii) CSbE] de membrana de celulose bacteriana com cultivos submersos com presença de celulose vegetal, 1 ou 3 folhas de papel germitex [respectivamente, (iii) CSbE-CV e (iiii) CSbE-3CV], podem ser visto no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Comparação da produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos, cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana e com celulose vegetal.



CSbE_10, CSbE-MCB_10, CSbE-CV e CSbE-3CV indicam o volume inicial de 10 mL, em cultivo submerso estático, cultivo submerso estático com membrana de celulose bacteriana, cultivo submerso estático com 1 folha de celulose vegetal e cultivo submerso estático com 3 folhas de celulose vegetal, respectivamente. 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.

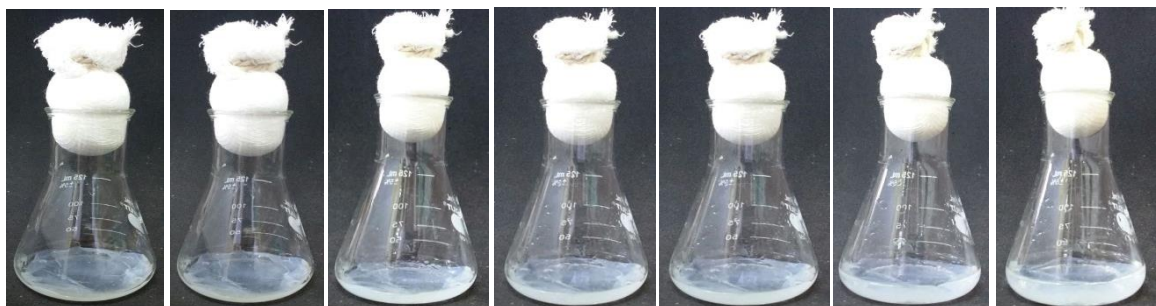
Através da comparação da produção de ramnolipídeos entre as dadas condições (Gráfico 7), pode-se observar que a presença de 3 folhas de celulose vegetal proporcionou uma maior produção de ramnolipídeos quando comparada ao cultivo com somente uma folha, que por sua vez teve a mesma produção que os cultivos submersos estáticos sem membrana (CSbE). Este resultado sugere que a diferença de produção pode estar relacionada com a altura da camada de meio, *i.e.*, quanto maior o número de membranas mais próximo da superfície as células se encontram. No entanto, quando comparado aos demais cultivos a presença da MCB proporcionou a maior produção de ramnolipídeos, sugerindo que esta apresenta outros benefícios além da diminuição da altura da camada de meio. Vale lembrar que a adição de mais de uma MCB por frasco Erlenmeyer não aumentou a produção de ramnolipídeos, mas aumentou o total de biomassa obtido (Gráfico 3). Deste

modo, por diminuir a altura da camada de líquido sobre as células e, provavelmente, interferir na taxa de transferência gasosa e aeração do sistema, esta estratégia promoveu maior oferta de oxigênio para as células e consequente maior taxa de crescimento durante o processo fermentativo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Adicionalmente, as membranas de celulose bacteriana utilizadas neste trabalho apresentam mais de 99 % do total de suas massas representados por água ou no caso das membranas utilizadas nos cultivos, por meio de cultivo (dados não mostrados), assim as MCB mantêm o cultivo constantemente úmido, e provavelmente auxiliam na difusão dos nutrientes do meio para as células bacterianas melhorando a conversão do glicerol em ramnolipídeos.

5.6.3 Comparação da Profundidade de Leito de Cultivo em Diferentes Volumes Iniciais de Meio em Cultivo Submerso Estático com Suporte Membrana de Celulose Bacteriana

O próximo bloco de experimentos teve como objetivo diminuir a camada de meio sobre as células desde o início dos cultivos. Os volumes iniciais de 2, 3, 5, 8, 10, 15 e 20 mL foram avaliados no sistema em cultivo submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana. Assim, as variações do volume inicial de meio de cultivo, promovem variações proporcionais na camada de meio que recobre a membrana (Figura 14).

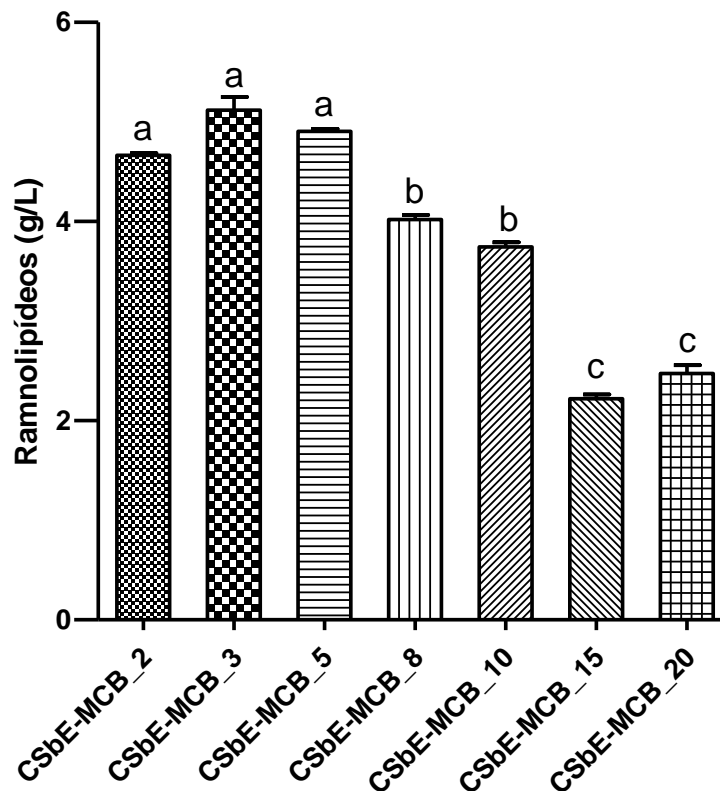
Figura 14- Comparação de diferentes alturas de volume inicial de meio em cultivos submersos estático em suporte de membrana de celulose bacteriana.



Os volumes são respectivamente da esquerda para direita, 2, 3, 5, 8, 10, 15 e 20 mL
Fonte: o próprio autor.

O aumento de profundidade de leito (em relação ao volume inicial de 10 mL, utilizado até o momento) causou uma queda significativa na produção de ramnolipídeos, enquanto a diminuição promoveu um incremento, também significativo, nos níveis de produção (Gráfico 8), provavelmente por interferir na taxa de transferência gasosa do sistema. A produção de ramnolipídeos aumentou 38 % e passou de 3,7 g/L com 10 mL de volume inicial para 5,1 g/L com o volume inicial de 3 mL (Gráfico 8). O presente resultado reforça a importância da altura do leito e sugerem que volumes iniciais entre 3 e 5 mL de meio por MCB por frasco Erlenmeyer apresentem a maior produção de ramnolipídeos.

Gráfico 8 - Produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos em suporte de celulose bacteriana. Avaliação de diferentes alturas de leitos.

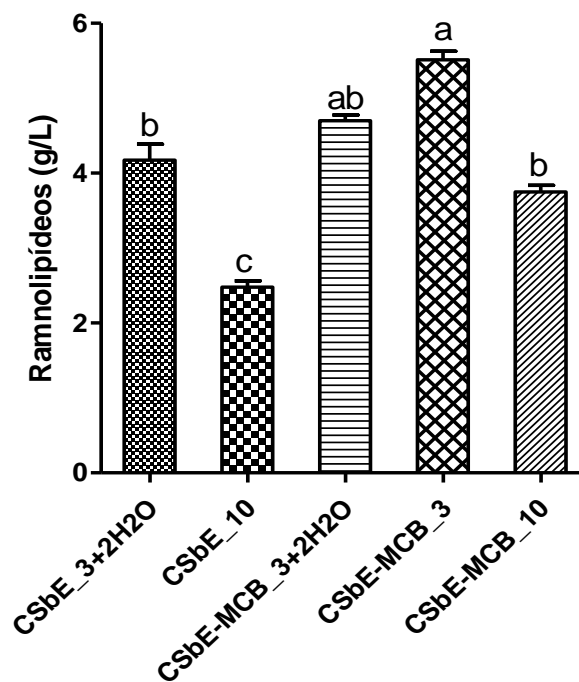


CSbE_MCB_2, CSbE_MCB_3, CSbE_MCB_5, CSbE_MCB_8, CSbE_MCB_10, CSbE_MCB_15 e CSbE_MCB_20, volumes iniciais de meio de 2, 3, 5, 8, 10, 15 e 20 mL, respectivamente. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. As diferentes letras minúsculas sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor <0,001.

5.6.4 Comparação da profundidade de leito de cultivo com ausência e presença da membrana de celulose bacteriana em cultivo submerso estático

No intuito de avaliar se a altura do leito também influenciaria os cultivos submersos estáticos na ausência de membrana de celulose bacteriana um novo bloco de experimentos foi realizado. A produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos (sem MBC) de leito baixo (3 mL iniciais) e leito alto (10 mL iniciais) são comparadas com a produção de ramnolipídeos por CSbE-MCB de leito baixo e alto, 3 mL ou 10 mL iniciais, respectivamente (Gráfico 9).

Gráfico 9- Produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos com diferentes alturas de leito na presença e na ausência de membrana de celulose bacteriana.



CSbE-MCB_3+2H₂O, CSbE-MCB_3 e CSbE-MCB_10, cultivos submersos estáticos com membrana de celulose bacteriana, volume inicial de 3 mL acrescido de 2 mL de H₂O, o volume inicial de 3 mL e o volume inicial de 10 mL, respectivamente. CSbE_10 e CSbE_3+ 2H₂O, cultivos submersos estáticos, volume inicial de 10 mL e volume inicial de 3 mL acrescido de 2 mL de H₂O no quarto dia de cultivo, respectivamente. 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.

Note que a adição de água destilada foi necessária nos cultivos com ausência de MBC, uma vez que estes ressecam durante o período de incubação. Adicionalmente, por finalidade comparativa, controles com a adição de água também foram feitos nos cultivos com MCB (Gráfico 9). A diminuição da altura do leito promoveu um efeito significativo na produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos (na ausência de MBC), 4,2 g/L com 3 mL iniciais de meio. Vale ressaltar que os maiores níveis de produção foram obtidos com a presença das MCB, sobretudo sem a adição de água (5,5 g/L de ramnolipídeos).

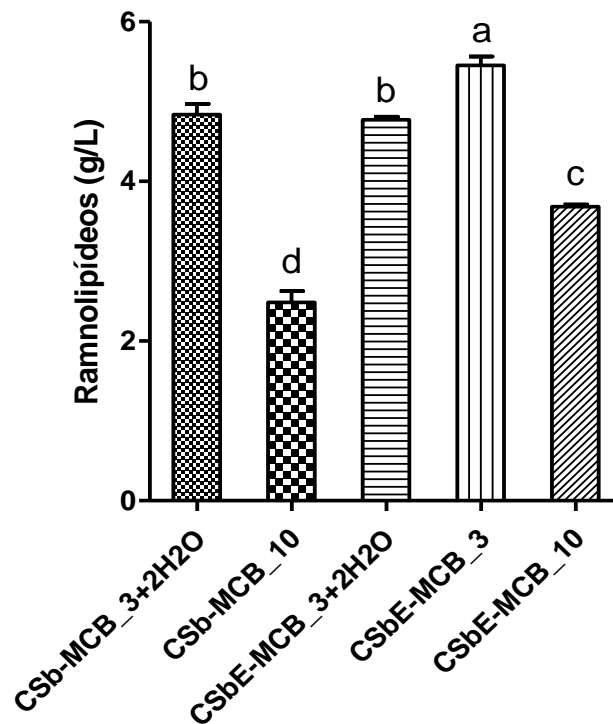
5.6.5 Avaliação do Efeito da Agitação dos Cultivos com Presença de Celulose Bacteriana e em Diferentes Profundidades de Leito

Este bloco de experimento teve como objetivo avaliar o efeito da aeração sobre a produção de ramnolipídeos em cultivos com presença de MBC conduzidos com agitação (200 rpm). Note que a adição de água destilada foi necessária nos cultivos submersos de leito baixo (3 mL de meio inicial, CSb-MBC_3+2H₂O), uma vez que estes ressecam durante o período de incubação com agitação. Adicionalmente, mesmo que desnecessário, por finalidade comparativa, controles com a adição de água também foram feitos nos cultivos com MCB de leito baixo (3 mL de meio inicial, CSbE-MBC_3+2H₂O) (Gráfico 10).

Os cultivos com leito alto (10 mL de meio inicial) apresentaram uma queda significativa na produção de ramnolipídeos quando estes foram submetidos à incubação com agitação (37 °C/ 200 rpm por 10 dias) (Gráfico 10). No entanto, para os cultivos de leito baixo a agitação não apresentou nenhum efeito significativo (Gráfico 10). Estes resultados indicam que a agitação e a adição de água ao sistema (2 mL de água destilada no quarto dia de cultivo, CSb-MBC_3+2H₂O e CSbE-MBC_3+2H₂O) influenciam negativamente a produção de ramnolipídeos. Adicionalmente, pode-se ainda traçar uma relação possível destes dois procedimentos (*i.e.*, agitação e adição de água) com a desestabilização de possíveis biofilmes formados sobre as membranas de celulose bacteriana. Como já mencionado (item 7.3), em sugestões para experimentos futuros com PAO1 transformada com plasmídeo que expressa proteína fluorescente verde (GFP) serão utilizados na avaliação da possível formação de biofilme sobre as MCB por

microscopia de fluorescência e confocal. Esta estratégia poderá reforçar a hipótese de que as MCB estejam funcionando como suporte para formação de biofilme e que este, por sua vez, não se forme adequadamente com agitação e nem com adição de água durante os cultivos. Finalmente, o presente resultado sugere que o efeito da agitação na aeração dos cultivos tenha uma influência positiva menor do que a influência negativa da agitação na possível formação de biofilme. Estudos futuros serão necessários para melhorar a discussão destes resultados.

Gráfico 10 - Produção de ramnolipídeos com diferentes alturas de leito por cultivos submersos e cultivos submersos estáticos ambos com presença de membrana de celulose bacteriana.



CSb-MCB_3+2H2O e CSb-MCB_10 indicam o volume inicial de 3 mL acrescentado de 2 mL de H₂O e 10 mL de volume inicial respectivamente, em cultivo submerso (200 rpm). CSbE-MCB_3+2, CSbE_3 e CSbE-MCB_10, volume inicial de 3 mL acrescentado de 2 mL de H₂O, volume inicial 3 mL e volume inicial de 10 mL respectivamente, em cultivo submerso estático com membrana de celulose bacteriana. 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.

5.7 ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

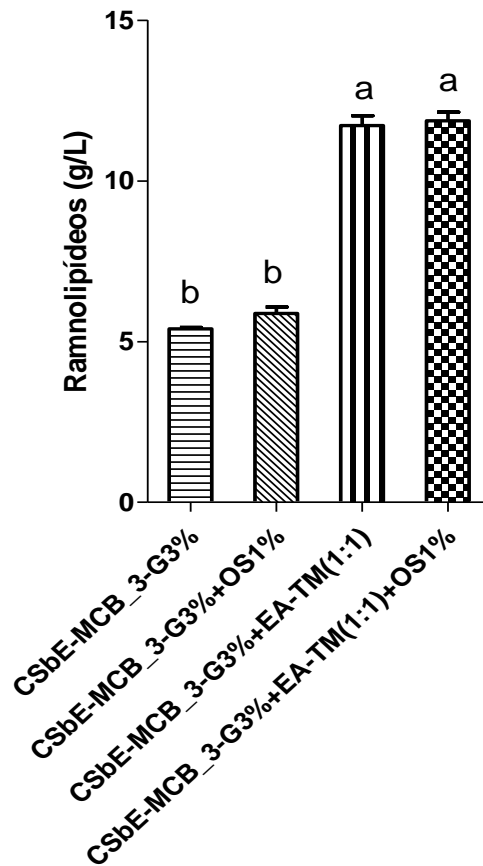
5.7.1 Utilização de óleo de soja e extrato aquoso de torta de milho como suplemento indutor de produção de ramnolipídeos

Com intuito de se aumentar a produção de ramnolipídeos por CSbE-MCB foram testadas adições dos substratos, óleo de soja e torta de milho, uma vez que estes compostos podem induzir a produção de ramnolipídeos (CAMILIOS-NETO et al., 2011). O óleo de soja é uma fonte de carbono, enquanto a torta de milho, além de fonte de carbono, também pode servir como fonte de nitrogênio (anexo 2 – composição centesimal da torta de milho). A hidrólise aquosa da torta de milho resulta em extrato aquoso rico em nutrientes que se assemelha à milhocina ou água de maceração de milho (do inglês, *corn steep liquor*). A milhocina é um subproduto do milho, um resíduo gerado pela indústria de beneficiamento de milho, que contém grande quantidade de matéria orgânica, nitrogênio, aminoácidos entre outros (ABIMILHO, 2018).

Este bloco de experimento partiu da melhor condição encontrada até o momento (i.e., 3 mL iniciais de meio de cultivo). Assim, a partir da dada condição, avaliou-se o efeito da suplementação do meio de cultivo com extrato aquoso de torta de milho (na proporção de 1:1 v/v, extrato aquoso de torta de milho:meio de sais), com óleo de soja e combinações de ambos (Gráfico 11). A adição de torta de milho proporcionou um incremento significativo na produção de ramnolipídeos, enquanto que a adição de óleo de soja, não proporcionou incremento significativo para ambas condições (i.e., óleo de soja e óleo de soja + torta de milho, comparados com seus respectivos controles) (Gráfico 11).

Uma vez que a adição de torta de milho mostrou-se promissora, em um novo bloco de experimentos avaliou-se a utilização deste extrato em outra proporção, de 1:1 para 1:2 (extrato aquoso de torta de milho: meio de sais), assim como diferentes concentrações de glicerol (3, 6 e 9 % v/v). Pode-se notar um aumento considerável na produção do tensoativo ao se utilizar o extrato aquoso de torta de milho em ambas proporções (Gráfico 12), ocorrendo a maior produção com a relação de 1:1 acrescentada de glicerol 6 % v/v (15,35 g/L de ramnolipídeos). Também, foi possível notar que o glicerol na concentração de 9 % v/v reprimiu a produção de ramnolipídeos nas duas proporções de extrato testadas.

Gráfico 11 - Produção de ramnolipídeos com a utilização de óleo de soja e extrato aquoso de torta de milho como suplementos indutores de produção de ramnolipídeos por cultivos submersos e cultivos submersos estáticos ambos com presença de membrana de celulose bacteriana.

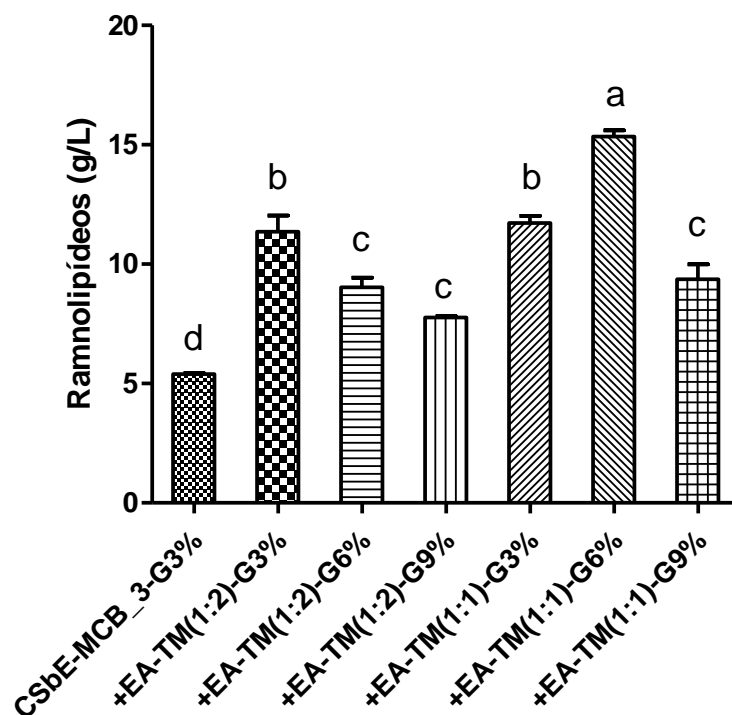


CSbE-MCB_3-G3% indica o volume inicial de 3 mL, acrescentado de 3 % v/v de glicerol, CSbE-MCB_3-G3%+OS1% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 3 % de glicerol e 1% m/v de óleo de soja, CSbE-MCB_3-G3%+EA-TM(1:1) indica o volume inicial 3 mL acrescentado de 3 % de glicerol e extrato aquoso de torta de milho 1:1 (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais) e CSbE-MCB_3-G3%+EA+TM(1:1)_OS1% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de acrescentado de 3 % de glicerol, extrato aquoso de torta de milho (1:1) (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais) e 1 % m/v de óleo de soja. 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.

Combinações de torta de milho com óleo de soja já foram testadas para produção de ramnolipídeos por fermentações em estado sólido e mostraram-se muito promissoras (CAMILIOS-NETO et al., 2011). No entanto, vale lembrar que no presente trabalho não seria possível a utilização da torta de milho direto no meio de cultivo, uma vez que, a adição desse subproduto sólido e insolúvel em água dificultaria a transferências gasosas que já são um limitante deste processo. O

mesmo pode-se dizer sobre a utilização do óleo de soja, a adição deste composto ao meio de cultivo promove dificuldades de transferência gasosa. Por outro lado, a utilização do extrato aquoso da torta de milho, um subproduto solúvel em água, possibilitou a indução esperada pela torta de milho sem o inconveniente de interferir nas trocas gasosas. A utilização deste extrato proporcionou ainda um incremento maior na produção quando somada a uma maior adição de glicerol de 3 para 6 % v/v.

Gráfico 12 - Produção de ramnolipídeos com a utilização de diferentes quantidades de glicerol acrescentados em duas proporções de extrato aquoso de torta de milho em cultivos submersos estáticos em suporte de membrana de celulose bacteriana.



CSbE-MCB_3-G3% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 3 % v/v de glicerol, +EA-TM(1:2)-G3% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 3 % v/v de glicerol e extrato de torta de milho (1:2) (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais), +EA-TM(1:2)-G6% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 6 % v/v de glicerol e extrato de torta de milho (1:2) (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais), +EA-TM(1:2)-G9% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 9 % v/v de glicerol e extrato de torta de milho (1:2) (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais), +EA-TM(1:1)-G3% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 3 % de glicerol e extrato de torta de milho (1:1) (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais), +EA-TM(1:1)-G6% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 6 % v/v de glicerol e extrato de torta de milho (1:1) (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais), +EA-TM(1:1)-G9% indica o volume inicial de 3 mL acrescentado de 9 % v/v de glicerol e extrato de torta de milho (1:1) (extrato aquoso de torta de milho:meio de sais). 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.

5.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS OBTIDOS POR CULTIVOS SUBMERSOS ESTÁTICOS EM SUPORTE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

Os resultados de produção obtidos com o presente processo fermentativo [5,5 g/L de ramnolípídeos, em CSbE_MCB com 3 mL iniciais de meio de cultivo (Gráfico 8)], não estão entre os valores mais altos encontrados na literatura científica. Entretanto, ao utilizar suplementos e indutores associados ao meio de cultivo, a produção de ramnolípídeos alcançou (15,34 g/L em CSbE-MCB-G3%+EA-TM(1:1) (Gráfico 12), apresentando um aumento substancial, o que torna o processo interessante. Resultados bem promissores já foram alcançados utilizando a mesma cepa modelo (PAO1), 39 g/L utilizando como fonte de carbono o óleo de girassol por fermentação em batelada com 30 L (MÜLLER e HÖRMANN, 2010), 29,5 g/L utilizando hidrolisado enzimático de resíduos de azeitona em frascos de 1 L (RAMIREZ et al., 2016). Resultados menos promissores, 0,39-0,43 g/L a partir de óleo de palma em frasco de 5 L (RADZUAN, BANAT e WINTERBURN, 2016), também podem ser encontrados.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho apresentam grande potencial em nível de produção. Além, de um grande avanço obtido, simplesmente, por se estabelecer um sistema de baixa interferência e de baixo custo. Este modelo poderá ser utilizado para futuros estudos aplicando tecnologias de última geração no sequenciamento de transcritos (transcriptoma por RNA-seq) que associados com outras tecnologias também massivas (do inglês "*high-throughput Technologies*"), proteoma e metaboloma, poderão trazer grandes avanços na compreensão do processo de produção de ramnolípídeos.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou ser possível produzir ramnolipídeos por cultivo submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana. A produção de ramnolipídeos por este processo promoveu incrementos na obtenção do biossurfactante de até 5x quando comparado com cultivos submersos. A quantidade de membranas não está diretamente relacionada com a produção de ramnolipídeos, a maior área de superfície não apresentou diferença significativa na produção de ramnolipídeos, e a presença da agitação combinada com a presença da membrana de celulose bacteriana resultou em queda significativa na produção de ramnolipídeos. Em linhas gerais, a mistura de ramnolipídeos obtidas no presente processo apresentou uma CMC que se enquadra entre os melhores resultados para ramnolipídeos encontrados na literatura científica, e a mistura de ramnolipídeos obtidas apresentou um elevado poder emulsificante. O presente processo proporcionou a produção de uma mistura de homólogos com maior abundância dos homólogos de di-ramnolipídeos (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀), o que pode ser uma grande vantagem na obtenção de estrutura única de maior abundância. Os resultados obtidos com o presente trabalho sugerem que a altura do leito de cultivo apresenta uma grande influência no processo. A maior produção de ramnolipídeos obtida neste trabalho foi de 15,34 g/L, na presença de 1 membrana de celulose bacteriana com 3 mL de solução umedecedora inicial, com adição de extrato aquoso de torta de milho na proporção de 1:1 e com 6 % v/v de glicerol, por 9 dias de cultivo à 37 °C. A tecnologia fermentativa, cultivo submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana, apresenta um grande potencial para viabilização da produção biotecnológica de surfactantes.

7. SUGESTÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS

A seguir são apontadas algumas sugestões para experimentos futuros nessa linha de pesquisa:

7.1 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO DO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL E DA PROPORÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE TORTA DE MILHO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

7.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA DA MISTURA DE RAMNOLIPÍDEOS OBTIDA A PARTIR DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

7.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ADESÃO À MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA DA ESTIRPE PARENTAL DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1 TRANSFORMADA COM PLASMÍDEO QUE EXPRESSA A PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP) POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E POR MICROSCOPIA CONFOCAL DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CSbE-MCB

REFERÊNCIAS

- ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 733-741, 2012.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HAUSMANN, R.; LEPINE, F.; MÜLLER, M. M.; DEZIEL, E. **Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production**, in: G. Soberón-Chávez (Ed.), *Biosurfactants: from Genes to Applications*, Microbiology Monograph, SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, v. 20, p. 13–55, 2011.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, R. Rhamnolipids: diversity of structures microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323-1336- 2010.
- ABIMILHO. **Associação Brasileira das Indústrias de Milho**. 2018.
- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223 p. 143–151, 2008.
- AIBA, S.; OKABE, M.; OKADA, M. Modified complex method as applied to an optimization of aeration and agitation in fermentation. **J. Ferment. Technol.**, 51 (8): 594-605, 1973.
- ALMEIDA, K. L. **Produção de ramnolipídeos por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolípideo**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2011.

ANDRÄ, J. RADEMANN, J.; KOCH, M. H. J.; HEINE, H.; ZÄHRINGER, U.; BRANDENBURG, K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 301-310, 2006.

APARNA, A., SRINIKETHAN, G., SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* **Colloids Surf.** v. 95, p. 23–29, 2012.

ARAUJO, A. A.; TISCHER, C. A.; CAMILIOS-NETO, D. **Modelo de Estudo de Virulência de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Crescida em Membrana de Celulose Bacteriana.** V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, Londrina/PR, 2015.

ARAUJO, L. V.; GUIMARÃES, C. R.; MARQUITA, R. L. S.; SANTIAGO, V. M. J.; SOUZA, M. P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171-178, 2016.

BAI, L.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 71-19, 2016.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BELLO, X. V.; DEVESA-REY, R., CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Study of the Synergistic Effects of Salinity, pH, and Temperature on the Surface-Active Properties of Biosurfactants Produced by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 1258-1265, 2012.

BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. On a metabolic product of *P. pyocyanea*, pyolipidic acid, active against *M. tuberculosis*. **Ark. Chem. Mineral Geol.**, v. 23(A), p. 1-12, 1946a.

BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. Pyolipidic acid. A metabolic product of *P. pyocyanea*, active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 10, p. 165-166, 1946b.

BHARALI, P.; KONWAR, B. K.; Production and Physico-chemical Characterization of a Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* OBP1 Isolated from Petroleum Sludge. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.164, p.1444, 2011.

BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, M., SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **J Appl Microbiol.**, v. 98, p. 456–463, 2005.

BORAH, S.N., GOSWAMI, D., LAHKAR, J., SARMA, H.K., KHAN, M.R., DEKA, S., Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* SS14 causes complete suppression of wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi in *Pisum sativum*. **Biocontrol** v. 60, p. 375–385, 2015.

BRANDLY, B.K.; WEIZE, O.A.; SCHNAAE, R.L. Cell attachment and long-term growth on derivatizable polyacrylamide surface. **J. Biologic. Chem.** v. 262, p.6431-6437, 1987.

BROWN, A.J. The chemical action of pure cultivation of *Bacterium aceti*. **J. Chem. Soc.** v. 49, p. 432-439, 1886.

BRUMANO, L. P.; ANTUNES, A. F.; SOUTO, S. G.; SANTOS, J. C.; VENUS, J.; SCHNEIDER, R.; SILVA, S. S. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource Technology.** v. 243, p. 264–272, 2017.

BURGER, M; GLASER, L.; BURTON, R. M. Enzymatic synthesis of a rhamnolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **Federation Proceedings**, v. 21, p. 2-82, 1963.

CAMILIOS NETO, D. **Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido**. 157f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2010.

CAMILIOS NETO, D; MEIRA JA, ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 81, p. 441-448, 2008.

CAMILIOS-NETO, D.; VIGNOLI, J. A.; CONCEICAO, K. S.; ALMEIDA, M. A.; SAWONIUK, I. C.; MARQUES, G. D.; TISCHER, C. A.; FARIA-TISHER, P. C. S. **Produção de ramnolipídeos por fermentação estática em suporte de membranas de celulose bacteriana**, 2017. Patente de Invenção. Número do registro: BR10201700663. Data de depósito: 30/03/2017.

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.

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.

CAMPESI, A.; **Avaliação da velocidade de cisalhamento média em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado**. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2007.

CARNEIRO, R. B. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2015.

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

CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 1, p.20-28, 2013.

COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiological Science**, v. 3, p.145-149, 1986.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepous*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 4-10, 1979.

COOPER, D.G; GOLDENBERG, B.G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species **Applied Environmental Microbiology**, v.53, p.224-229, 1987.

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

COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: rhamnolipídeos e polihidroxicanoatos.** 138f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2010.

COSTA, S. G. V. A.O.; NITSCHKE, M.; LEPINE, F.; DEZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochem.** v. 45, p. 1511–1516, 2010.

DAMIAO, A. O. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com ramnolipídeos.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA. 74p., 2012.

DAVEY, M.E.; CAIAZZA, N.C; O'TOOLE, G.A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 1027-1036, 2003.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **C. R. Chim.**, 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. 67, p. 47-64, 1997.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil sample. **Applied Microbial Biotechnology**, v.69, p.192-199, 2005.

DUBEAU, D.; DÉZIEL, E.; WOODS, D.; LÉPINE, F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC Microbiol.**, 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.

DUYNJAK, Z.; KOSARIC, N. Production and release of surfactants by *Corynebacterium jeikeium* in hydrocarbon and glucose media. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 793-796, 1985.

ELSHIKH, M.; FUNSTON, S.; CHEBBI, A.; AHMED, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, v. 36, p. 26-36, 2017.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; COSTA, C. A. R.; TOZETTI, I.; DALL'ANTONIA, L. H.; VIDOTTI, M. Structure and effects of gold nanoparticles in bacterial cellulose–polyaniline conductive membranes. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 9571-9580, 2016.

FELSE, A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K. J.; GROSS, R. A. Sphorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, p. 316-323, 2006.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. J. **Appl Microbiol**, v. 114, p. 373–383, 2013.

Global Market Insights, 2016. Biosurfactants Market Size By Product, By Application, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Potential, Price Trend, **Competitive Market Share & Forecast**. p. 100, 2016-2023.

GOELZER, F. D. E.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; VITORINO, J. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; TISCHER, C. A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 546–551, 2009.

GUNTHER, N. W.; NUÑEZ, A.; FORTIS, L.; SOLAIMAN, D. K. Y. Proteomic based investigation of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 33, p. 914-920, 2006.

GUPTA, R. **Biosynthesis of novel Sophorolipids using *Candida bombicola* ATCC 22214: Characterization and applications**. Thesis (Biotechnology), 176p., The University of Pune, Índia, 2012.

HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R.; MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 316-322, 2003.

HÄUSSLER, S.; NIMTZ, M.; DOMKE, T.; WRAY, V.; STEINMETZ, I. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1588-1593, 1987.

HERNANDEZ, D.; DIAS, F. M.; ROWE, J. J. Nitrate Transport and Its Regulation by O₂ in *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. 286, p. 159-163, 1991.

HERYANI, H.; PUTRA, M. D.; Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus sp.* **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 49-54, 2017.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T.H.; NUSSER, M.; KIRSCHÖFER, F.; BRENNERWEISS, G.; FRANZREB, M.; BERENSMEIER, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 1579, 2008.

HILL, E.B.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P. *Pseudomonas* In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L., PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology: Washington, v. 1, p. 734, 2007.

HOLLOWAY, B. W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Gen. Microbiol.**, 13, 572, 1955.

ISMAIL, W.; SHAMMARY, S. A.; EL-SAYED, W. S.; OBUEKWE, C.; NAYAL, A. M. E.; RAHEEM, A. S. A.; AL-HUMAM, A. S. Stimulation of rhamnolipid biosurfactants production in *Pseudomonas aeruginosa* AK6U by organosulfur compounds provided as sulfur sources. **Biotechnology Reports**. v. 7, p. 55-63, 2015.

ITO, D.; INOUE, S. Sophorolipids from *Torulopsis bambicola*: possible relation to alkane uptake. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1278-1283, 1982.

IUPAC Technical Reports and Recommendations (1993).

JADAV, S.; SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S.; Effect of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the formation kinetics of methane hydrates, **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 43, p. 156-166, 2017.

JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 379-386, 2013.

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.

JOHANN, S.; SEILER, T. B.; TISO, T.; BLUHM, K.; BLANK, L. M.; HOLLERT, H. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. **Science of the Total Environment**. v. 548-549, p. 155-163, 2016.

JOY, S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**. v. 317, p. 232–241, 2017.

RAMÍREZ, I. M.; VAZ, D. A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMÁN, M. G. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 1-6, 2016.

KRIEGER, N; CAMILIOS NETO, D; MITCHELL D.A. 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.** 160p. Tese (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro/RJ. 2007.

KURTZMAN, C. P.; PRICE, N. P. J.; RAY, K. J.; KUO, T. M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicolye* clade. **Microbiology Letters**, v. 311, p. 140-146, 2010.

LAN, G.; FAN, Q.; LIU, Y.; CHEN, C.; LI, G.; LIU, Y.; YIN, X. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 44-54, 2015.

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.

LEE, S.; LEE, J.; YU, H.; LIM, J. Synthesis of environment friendly biosurfactants and characterization of interfacial properties for cosmetic and household products formulations. **Colloids and Surfaces**, 2017.

LIU, Y.; ZENG, G.; ZHONG, H.; WANG, Z.; LIU, Z.; CHENG, M.; LIU, G.; YANG, X.; LIU, S. Effect of rhamnolipid solubilization on hexadecane bioavailability enhancement or reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, p. 394-401, p. 2016.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose **Biotechnology Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1987.

LONG, B.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 71–79, 2016.

LONG, X. L.; SHEN, C. S.; HE, N.; ZHANG, G.; MENG, Q. Enhanced rhamnolipids production via efficient foam-control using stop valve as a foam breaker. **Bioresource Technology**. v. p. 2016.

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

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.

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.

MAWGOUD, A.; LEPINE, A. M.; LEPINE, F. DEZIEL, E. Rhamnolipids Déziel E. diversity of structures, microbial origins and role. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, p. 1323–1336, 2010.

MEIRA, J. A. **Produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). 94p. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2007.

MONTEIRO, A. A. **Caracterização molecular e estrutural de biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. Tese (Doutorado em Química Orgânica). 118p. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2007.

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

MÜLLER, M. M.; HÖRMANN, B.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Biotechnological products and process engineering**, v. 87, p. 167-174, 2010.

MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R.; J. Rhamnolipids--next generation surfactants? **Biotechnol**, v. 162, p. 366, 2012.

MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85, p. 111-125, 2001.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactantes. **Environ Pollut**, v. 133, ed. 2, p. 183–198, 2005.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 231-238, 2014.

NATSURFACT. Disponível em: <<http://www.natsurfact.com>>. Acesso em: 25 set. 2017

NAYAK, A. S.; VIJAYKUMAR, M. H.; KAREGOUDAR, T. B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp PNK-04 and its application in bioremediation. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 63, p. 73-79, 2009.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J. Bacteriol.**, v. 104, p. 313-322, 1970.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas-derived* molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 621-630, 2011.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. P. **Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações**. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2002.

OBASLI, D.; ASLIM, B. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. **J. Environ. Biol.**, v. 30, p. 161-173, 2009.

OLIVEIRA, S. A.; SILVA, B. C.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; URBANO A.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 642, 653, 2017.

OLIVEIRA, M. R.; CAMILIOS-NETO, D.; BALDO, C.; MAGRI, A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Biosynthesis and Production of Sophorolipids. **International Journal of Scientific & technology Research**, v. 3, p. 133-146, 2014.

OLIVEIRA, A. C. S. M. **Recuperação e purificação de Rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* P029-HVIA utilizando melaço de cana como substrato.** 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2010.

OLIVEIRA, F. J. S.; VAZQUEZ, L. DE CAMPOS, N. P. DE FRANÇA, F. P. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process. Biochem.**, v. 44, p. 383-389, 2009.

OLIVEIRA, G. M.; BASMAJI, P.; COSTA, L. M. M.; SANTOS, M. L.; RICCARDI, C. S.; GUASTALDI, F. P. S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; CAPOTE, T. S. O.; PIZONI, E.; GUASTALDI, A. C. Surface physical chemistry properties in coated bacterial cellulose membranes with calcium phosphate. **Materials Science and Engineering.** v. 75, p. 1359-1365, 2017.

PIRÔLLO, M. P. S.; **Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos.** 2006. 73f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências, Rio Claro/SP.

RADZUAN, M.; BANAT, I.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste, **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99-105, 2016.

RAHMAN, P.; LUNGUT, A.; IDOWU, J.; OLEA, M. Biosurfactant production using novel bacteria from Northeast England. **BUILDING BUSINESS ON BIOSCIENCE SUSTAINABLE INNOVATION CONFERENCE**, Edinburgh: Heriot-Watt University, 2009.

RAMIREZ, I. M.; VAZ, D. A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMAN, M. G. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 1-6, 2016.

RANDHAWA, K. K.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in microbiology**. v. 5, p. 454, 2014.

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

REDDY, K. S., KHAN, M. Y., ARCHANA, K., REDDY, M. G., HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agente. **Bioresource Technology**. v. 221, p. 291–299, 2016.

REIS, R. S. **Estudo proteômico de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 durante a produção de ramnolípídeo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Instituto de Química/ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

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

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609-618, 2006.

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

RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D. L.; ROSENBERG, E. Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of chloramphenicol. **Journal of Bacteriology**, v. 152, p. 126-132, 1982.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988.

Electronic Journal of Biotechnology, v. 17, p. 34-38, 2014.

SALGADO, J. P. **Produção de biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos industriais e substratos de baixo custo.** Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande/PB, 2013.

SANDOZ, K. M.; MITZIMBERG, S. M.; SCHUSTER M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 15876-15881, 2007.

SANTANA FILHO, A. P. **Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: estudos de produção e de variação da composição de homólogos.** 87p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2009.

SANTOS, D. K.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in biorreator and evaluation of its toxicity for a application as a bioremediation agente. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 20-27, 2017.

SANTOS, D.K.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **Int. J. Mol. Sci.** v. 401, p. 1–31, 2016.

SAXENA, I.M.; BROWN JR., M.R. Biochemistry and Molecular Biology of Cellulose Biosynthesis in Plants: Prospects for Genetic Engineering. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 135-160, 2008.

SCARTAZZINI, L., S.; **Utilização do Biorreator Airlift na pré-fermentação do mosto de uva**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 29-32, 2001.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. Cap. 8 in W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; A AQUARONE, E.; BORZANI, Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial), **Ed. Edgard Blucher Ltda**, vol. 2, São Paulo, 2001.

SHEPPARD, J.D., MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 110-116, 1987.

SILVA, G. P.; MACK, M. CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances** v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SILVA LIMA, Tânia Maria. **Produção de Biossurfactantes visando ao tratamento de Borra Oleosa**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 81p., 2003.

SILVA, D.P.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.91, n.3, p.605-613, 2001.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S. L.; 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, K. S.; 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. 406, n. 6799, p. 959-964, 2000.

SIVASAMY, S.; GANESH, P. K.; SIVAGNANAM, A.; SUNDARASAMY, M.; YESU, B. S.; KARUTHA, P. S. Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production, **Journal of Proteomics**, v.145, p. 112-126, 2016.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. S. SURFACTANTS: From Genes to Applications. **Microbiology monographs**, v. 20, p.2-216, 2011.

SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE, F.; DÉZIEL., E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SOUSA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; CRUZ, A. J. G. Cinética e caracterização de Rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glycerol como fonte de carbono. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, 43, 2014.

STÜWER, O.; HOMMEL, R.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H. P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 259-69, 1987.

TAHSEEN, R.; AFZAL, M.; IQBAL, S.; SHABIR, G; KHAN, Q. M.; KHALID, Z. M.; BANAT, I. M. Rhamnolipids and nutrientes boost remediation of crude oil-contaminated soil by enhancing bacterial colonization and metabolic activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 115, p. 192-198, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12^a ed., Porto Alegre: Editora Artmed. P. 266, 267, 2012.

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.

VALPUESTA, R. **Otimização da Produção de Biossurfactante por Isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-Prima Renovável e de Baixo Custo.**

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2008.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**. v. 232, p. 389–397, 2017.

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.

WANG, F.; JIN, Z.; ZHENG, S.; LI, H.; CHO, S.; KIM, H. J.; KIM, S.J.; CHOI, E.; PARK, J.O.; PARK, S. High-fidelity bioelectronic muscular actuator based on porous carboxylate bacterial cellulose membrane. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 250, p. 402, 411, 2017.

WANG, Q.; FANG, X.; BAI, B.; LIANG, X.; SHUKER, P. J.; GODDARD, W. A.; TANG, Y. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. **Biotechnol Bioeng**, v. 98, p. 842-853, 2007.

WATANABE, K.; ETO, Y.; NAKAMORI, S.; SHIBAI, H.; YAMANAKA, S. A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. **Cytotechnology**, v. 13, p. 107-114, 1993.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**. v.27, p.146-154, 2005.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers.

Biodegradation, v. 7, p.415-423. 1997.

WOZNIAK-KARCZEWSKA, M.; MYSZKA, K.; SZNAJDROWSKA, A.; SZULC, A.; ZGOLA-GRZESKOWIAK A.;LAWNICZAK, L.; CORVINI, P. F. X.; CHRZANOWSKI, L. Isolation of rhamnolipids-producing cultures from faeces: Influence of interspecies communication on the yield of rhamnolipid congeners. **New Biotechnology**, v. 36, p. 17-25, 2017.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N. FREDRICKSON, H. L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1706-1713, 1995.

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.

ZARAGOZA, J.A.; ARANDA, T. F. J.; ORTIZ, A. Interaction of a trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 with a secretory phospholipase A2, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 408, p.132-127, 2013.

ZHAO, F.; SHI, R.; CUI, Q.; HAN, S.; DONG, H.; ZHANG, Y. Biosurfactant production under diverse conditions by two kinds of biosurfactant-producing bacteria for microbial enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**. v. 157, p. 124–130, 2017.

ZHENG, H.; SINGH, N.; SHETYE, G. S.; JIN, YUCHENG, J.; LI, D.; YAN-YEUNG, L. Synthetic analogs of rhamnolipids modulate structured biofilms formed by rhamnolipid-nonproducing mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 25, p. 1830-1838, 2017.

ANEXOS

ANEXO 1

Pedido de patente dos dados obtidos com a presente dissertação

CAMILIOS-NETO, D.; VIGNOLI, J. A.; CONCEICAO, K. S.; ALMEIDA, M. A.;
SAWONIUK, I. C.; MARQUES, G. D.; TISCHER, C. A.; FARIA-TISHER, P. C. S.

Produção de ramnolipídeos por fermentação estática em suporte de membranas de celulose bacteriana, 2017. Patente de Invenção. Número do registro: BR10201700663. Data de depósito: 30/03/2017.



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 006630 4

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

ANEXO 2

Composição centesimal da torta de milho

	Torta de milho*
Lipídeos	0,7
Proteína	12,5
Carboidratos	55,0
Fibras	4,0
Resíduo Mineral	4,0
Umidade	13,0

* Fonte: Caramuru-comunicação pessoal.