



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOINTERAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a  
bioprospecção de genes relacionados com raminolipídeos**

**ALDINÉIA OLIVEIRA DAMIÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**SALVADOR – BA**

**2012**

ALDINÉIA OLIVEIRA DAMIÃO

**Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a  
bioprospecção de genes relacionados com raminolipídeos**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO:**

---

Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida  
Universidade Federal da Bahia-UFBA

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Josilene Borges T. Lima Matos  
Universidade Federal da Bahia-UFBA

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Elinalva Maciel Paulo  
Universidade Estadual de Feira de Santana

**Orientador:**

---

Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

**Co-orientadores:**

---

Prof. Dr. Milton R. Abreu Roque  
Universidade Federal da Bahia-UFBA

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Cristina Maria Quintella  
Universidade Federal da Bahia-UFBA

**SALVADOR – BA**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de  
Saúde, SIBI - UFBA.

D158 Damião, Aldinéia Oliveira

Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*  
e a bioprospecção de genes relacionados com ramnolipídeos /  
Aldinéia Oliveira Damião. – Salvador, 2012.

73 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde , 2012.

1. Biossurfactantes. 2. Ramnolipídeos. 3. Pseudomonas 4.  
Glicerina 5. Expressão Gênica. I. Almeida, Paulo Fernando de.  
II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 57.08



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

**Produção de biossurfactante por pseudomonas aeruginosa e a bioprospecção de genes relacionados com ramnolipídeos**

Elaborada por:

**ALDINEIA OLIVEIRA DAMIÃO**

e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

**MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 23 de novembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

---

**Dr. Paulo Fernando de Almeida**  
Orientador  
Universidade Federal da Bahia

---

**Dra. Josilene Borges Torres Lima Matos**  
Examinadora Interna  
Universidade Federal da Bahia

---

**Dra. Elinalva Maciel Paulo**  
Examinadora Externa  
Universidade Estadual de Feira de Santana

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me presenteado com o dom da vida e ao longo da minha existência ter me dado saúde e força para alcançar os meus objetivos;

Aos meus pais (Antônio Damião e Valdilene Damião) pelo apoio que sempre me deram e por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes da minha vida; amo muito vocês.

As minhas irmãs Alcinéia Damião e Valdinéia Damião que sempre estiveram ao meu lado me apoiando; vocês são especiais.

A minha sobrinha Ludmila Damião e ao meu namorado Gerferson Bittencourt pelo grande carinho dado, e por sempre conseguirem levantar o meu astral quando as coisas davam errado no laboratório. Amo vocês.

Ao meu orientador professor Paulo Almeida por ter aberto as portas do LABEM para que eu pudesse desenvolver minhas pesquisas, proporcionando o meu crescimento científico. Agradeço também pelas correções, pela paciência e por ter contribuído para que este trabalho chegasse a um consenso.

Ao professor Milton Roque e a professora Josilene Matos pelas orientações, paciência e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Cristina Quintella por ter contribuído com a bolsa de estudo.

Ao Sidnei Cerqueira por ter me apresentado ao LABEM, sendo o ponta pé inicial para que eu pudesse chegar até aqui.

A Brena Moitinho e Luiz Batista pelo auxílio em muitos momentos da minha pesquisa, pelo apoio nos momentos difíceis e principalmente pela amizade.

A Fúlvia por “quebrar alguns galhos” durante o meu mestrado.

A meus amigos Alexandre Marques e Cimille Antunes pelas valiosas conversas e discussões que tornaram este trabalho mais leve e fácil de ser conduzido.

A professora Danielle Takahashi pelas consultorias sobre real time e bioestatística;

A toda equipe do LABEM, pela troca de experiência, convívio e amizade. Gostaria de agradecer muito a todos vocês.

A Gabriela Brito e Kenya Felicissimo, por se preocupar com o meu trabalho, sempre me ligando para saber se as coisas estão dando certo.

Ao apoio dos laboratórios parceiros: Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/UFBA); Laboratório de Imunologia (Labimuno/UFBA) em especial Dona Chica e ao Laboratório de Bioprospecção (Bioprospector/UFBA).

A Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), em especial Alcinéia Damião e Silvana Paz, pelo grande apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Ednildo Torres por ter fornecido a Glicerina Bruta.

Ao apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

A CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de estudo.

A PETROBRAS pelo auxílio financeiro através do Termo de Cooperação No. **4600202295**

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse aqui.

Muito obrigada!!!!!!!

*“Só quando a última árvore for derrubada, o último peixe for morto e o último rio for poluído é que o homem perceberá que não pode comer dinheiro.”*

(Provérbio Indígena)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivo Específico	7
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>8</b>
3.1. Surfactantes	8
3.2. Biossurfactante	9
3.3. Raminolipídeos	13
3.3.1. Estrutura e síntese do raminolipídeo	14
3.4. Gênero <i>Pseudomonas</i>	17
3.5. Glicerina Bruta	19
3.6. Aspectos Econômicos	20
3.7. Real Time PCR	21
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Produção de biossurfactante utilizando glicerina bruta, uma alternativa biotecnológica sustentável</b>	<b>25</b>
<b>4.1.1. Introdução</b>	<b>26</b>
<b>4.1.2. Materiais e Métodos</b>	<b>28</b>
4.1.2.1. Micro-organismos	28
4.1.2.2. Produção do Inóculo	28
4.1.2.3. Índice de emulsificação	29
4.1.2.4. Extração e quantificação de raminolipídeo	29
4.1.2.5. Análise da tensão superficial	29
4.1.2.6. Análise do raminolipídeo em CP	30
4.1.2.7. Avaliação da estabilidade do raminolipídeo produzido	30
4.1.2.8. Análise estatística	30
<b>4.1.3. Resultados e Discussões</b>	<b>30</b>
4.1.3.1. Índice de emulsificação (E24)	30
4.1.3.2. Quantificação do raminolipídeo em g/L	32
4.1.3.3. Análise da tensão superficial	33
4.1.3.4. Análise cromatográfica	35
4.1.3.5. Estabilidade do raminolipídeo	36



<b>4.1.4. Conclusões</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1.5. Referências</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2. Bioprospecção de genes relacionados com a produção de biosurfactante raminolipídeos</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2.1. Introdução</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2.2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>45</b>
4.2.2.1. Indução gênica e Produção do raminolipídeo .....	45
4.2.2.2. Extração e quantificação do raminolipídeo .....	45
4.2.2.3. Análise da expressão Gênica .....	46
<b>4.2.3. Resultados</b> .....	<b>48</b>
4.2.3.1. Quantificação do raminolipídeo .....	48
4.2.3.2. Análise da expressão Gênica – <i>CCMICS 106</i> .....	49
4.2.3.3. Análise da expressão Gênica – <i>CCMICS 109</i> .....	50
<b>4.2.4. Discussões</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2.5. Conclusões</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.6. Referências</b> .....	<b>54</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

APENDICE

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CT - Cycle Threshold

CCMICS- Coleção de Cultura de Microrganismos do Instituto de Ciências da Saúde

C/N- Relação carbono nitrogênio

CMC - Concentração Micelar Crítica

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

E<sub>24</sub> - Índice de emulsificação avaliado após 24 horas.

GB- Glicerina Bruta

g/L - Grama por Litro

LABEM - Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos

LB- Luria-Bertani

mg - Miligrama

nm- nanômetros

mN.m- Milinewton por metro

MSM – Meio Salino Mineral

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

qPCR - PCR quantitativa ou PCR em Tempo real

QS- Quorum Sensing

rpm – Rotação por minuto

RT –qPCR- Quantitative reverse transcription-PCR)

v/v - Volume por Volume

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> -Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo .....	8
<b>Figura 02</b> - Ação dos biossurfactantes sobre o petróleo.....	10
<b>Figura 03</b> - Estruturas das moléculas de raminolipídeo produzidas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
<b>Figura 04</b> - Modelo da regulação da produção de raminolipídeos em <i>P. aeruginosa</i> .....	17
<b>Tabela 01</b> - Estabilidade do Biossurfactante em mN/m – CCMICS 06 .....	37
<b>Tabela 02</b> - Estabilidade do Biossurfactante em mN/m – CCMICS 09 .....	37

## RESUMO

Os biossurfactantes têm sido objeto de estudo em diversas áreas da biotecnologia, uma vez que estes apresentam propriedades biológicas aplicáveis a várias indústrias, tais como, a farmacêutica, de petróleo, de cosméticos e de alimentos. São capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, e possuem vantagens importantes sobre os surfactantes químicos, pois além de serem menos tóxico e mais biodegradáveis, apresentam maior resistência às variações de temperatura, pH e a condições de elevada salinidade. Os biossurfactantes mais estudados são os raminolipídeos produzidos por bactéria do gênero *Pseudomonas*. Uma das alternativas para a melhoria do processo de produção seria a redução do custo, utilizando fontes de carbono reaproveitadas, como a glicerina bruta, por exemplo. Devido a grande importância biotecnológica dos raminolipídeos, este trabalho teve como objetivo investigar a produção de raminolipídeo em duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (*CCMICS 106* e *CCMICS 109*) em Meio Salino Mineral (MSM) utilizando como fonte de carbono glicerina comercial (GC) e glicerina bruta (GB) a 2% e analisar a expressão genica das cepas no momento da produção. Observou-se que no MSM 2% GB as linhagens *CCMICS 106* e *109* produziram 2,87 g/L e 2,31 g/L respectivamente. Já no MSM 2% GC as linhagens produziram 2,47 g/L e 3,96 g/L. O biossurfactante produzido pelas linhagens apresentou uma boa redução da tensão superficial (26mN/m a 30mN/m), assim como apresentou uma boa estabilidade quanto a temperatura, salinidade e pressão. Os resultados da produção demonstraram a viabilidade da utilização de glicerina bruta como substrato e como fonte alternativa de carbono e de baixo custo. Analisando a expressão gênica observou-se que no MSM2%GB a linhagem *CCMICS 106* que apresentou uma produção um pouco maior, apresentou também uma maior expressão do gene *rhlAB* que constitui o operon responsável pela produção de ramnolipideo. Já no MSM2%GC a linhagem *CCMICS 109* apresentou uma maior produção, porém neste meio de produção a expressão do gene *rhlAB* foi mais baixa, indicando assim que a mínima expressão deste gene no MSM2%GC foi suficiente para produzir uma maior quantidade de raminolipídeo.

**Palavras Chaves:** Biossurfactantes, Raminolipídeos, *Pseudomonas*, Glicerina, Expressão gênica.

## ABSTRACT

The biosurfactants have been studied in various areas of biotechnology, since they have biological properties applicable to various industries, such as pharmaceuticals, oil, cosmetics and food. They are capable of reducing the surface tension and interfacial, and have important advantages over chemical surfactants, as well as being less toxic and more biodegradable, exhibit greater resistance to temperature changes, pH, and high salt conditions. The most studied biosurfactants are rhamnolipids produced by bacteria of the genus *Pseudomonas*. One alternative for improving the manufacturing process would decrease the cost of using carbon sources reused as the raw glycerin, for example. Due to the great importance of biotechnology rhamnolipids, this study aimed to investigate the production of rhamnolipids in two strains of *Pseudomonas aeruginosa* (*CCMICS 106* and *109*) in Saline Mineral Medium (MSM) using glycerol as a carbon source commercial (GC) and glycerin Crude (GB) 2% and analyze the gene expression strains at the time of production. It was observed that MSM in GB 2% strain *CCMICS 106* and *109* produced 2.87 g / L and 2.31 g / L respectively. Already in the MSM 2% GC strains produced 2.47 g / L and 3.96 g / L. The biosurfactant produced by the strains showed good surface tension reduction (26mN/m the 30 mN / m) and presented good stability as temperature, salinity and pressure. The production results demonstrated the feasibility of using crude glycerol as substrate and as an alternative source of carbon and of low cost. Analyzing gene expression observed that in MSM2% GB strain *CCMICS 106* which showed a slightly higher production, also showed increased expression of the gene operon *rhlAB* which is responsible for the production of rhamnolipids. Already in MSM2% GC strain *CCMICS 109* showed a higher yield, but in this production medium *rhlAB* gene expression were lower, indicating that the expression of this gene at least MSM2% GC is sufficient to produce a greater amount of rhamnolipids.

**Key Words:** Biosurfactants, Rhamnolipids, *Pseudomonas*, Glycerin, Gene expression.

## 1. INTRODUÇÃO

Os tensoativos ou surfactantes são moléculas constituídas por grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que agem nas interfaces de líquidos e mesmo em superfícies sólidas modificando as tensões superficial e interfacial, adquirindo diversas propriedades com aplicações industriais, tais como detergência, emulsificação, solubilização, umectabilidade, espumantes, atividade antimicrobiana, dentre outras. Introduzidos na civilização pelos fenícios, eram produzidos a partir de gorduras animal e vegetal, sendo posteriormente sintetizados quimicamente. Mais recentemente, por razões legais e de competição comercial, os fabricantes foram obrigados a introduzirem compostos mais biodegradáveis para reduzir o impacto ambiental.

A produção de surfactantes ou tensoativos por micro-organismos apresenta diversas vantagens sobre os tensoativos sintéticos em particular pela sustentabilidade e por gerar novas possibilidades de aplicação industrial. Dentre essas vantagens destacam-se a biodegradabilidade, baixa toxicidade e por serem produzidos a partir de substratos renováveis, permitindo a utilização de resíduos e co-produtos das agroindústrias e de biocombustíveis. O uso dos biosurfactantes nas indústrias tem sido limitado devido aos custos elevados de produção e recuperação em comparação aos sintéticos, porém as suas propriedades químicas, físico-químicas e biológicas tem despertado a atenção de empresários e pesquisadores haja visto volumes substanciais de publicações sobre o assunto. A tendência de substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais é motivada pela necessidade da diminuição de produtos de difícil biodegradabilidade por substâncias mais específicas e menos agressivas ao ambiente.

Os biosurfactantes são classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biosurfactantes poliméricos, fosfolipídeos e ácidos graxos. Dentre os glicolipídeos, os mais estudados são os raminolipídeos produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Outro aspecto que merece destaque para a produção de biosurfactantes está associado aos avanços nas técnicas de biologia molecular que permitem efetuar estudos genéticos de triagem e seleção de micro-organismos melhores produtores desses compostos. Técnicas moleculares como *Real-Time PCR* (RT-qPCR) possibilitam ainda estudar os genes, compreender melhor os mecanismos metabólicos envolvidos na sua expressão e regulação, de modo a permitir otimizar a produção desse importante composto.

Finalmente, este trabalho envolve o desenvolvimento de um método rápido de triagem de cepas de *Pseudomonas* produtoras de raminolipídeos, seleção de melhores

produtores empregando a glicerina bruta como fonte de carbono e avaliação de técnicas de RT-qPCR, para a identificação dos genes produtores de raminolipídeos, e da quantificação de sua expressão. Dessa forma espera-se entender melhor a regulação dos genes responsáveis pela produção de raminolipídeos de modo a poder contribuir no futuro para aplicar esse conhecimento no aumento do rendimento deste bioproduto em nível de produção industrial.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de raminolipídeos utilizando glicerina bruta e comercial e a bioprospecção de genes envolvidos na produção desse composto.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a viabilidade da produção de biossurfactante por duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, em meio de cultura suplementado com glicerina bruta e comercial;
- Analisar o raminolipídeo produzido através do estudo da tensão superficial e estabilidade;
- Estudar os genes relacionados com a produção de raminolipídeo (*rhlI*, *rhlAB*, *rhlC*) nas cepas bacterianas produtoras de biossurfactantes;
- Quantificar a expressão de genes que está relacionado com a produção de raminolipídeos, e avaliar se a maior expressão está relacionada com a maior produção.

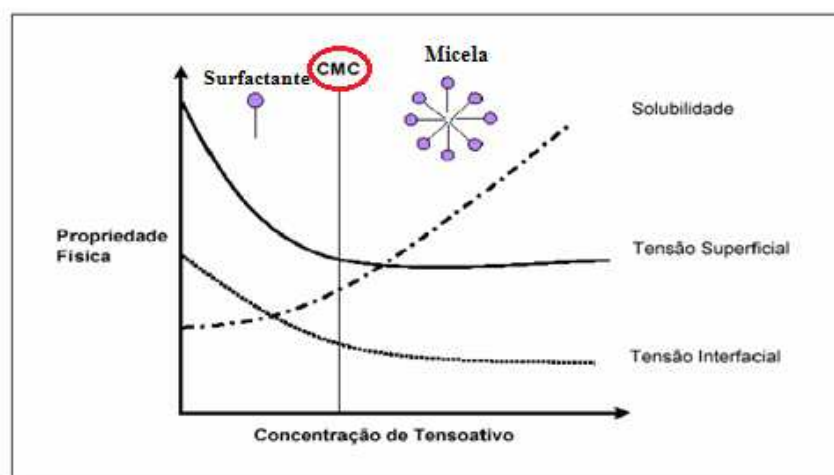


### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (NITSCHKE e PASTORE 2002). Estes compostos constituem uma importante classe de produtos químicos largamente utilizados na indústria moderna, com aplicação na indústria farmacêutica, cosmética, petroquímica e alimentícia uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos, que apresentam baixa solubilidade em água. São compostos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, e por isso permitem misturar ou dispersar imediatamente como emulsões em água (BANAT et al., 2000 apud STRELEC, 2006). As tensões superficial e interfacial referem-se ao posicionamento das moléculas nas interfaces ar/líquido e líquido/líquido respectivamente, com uma orientação específica também conhecida como adsorção (MONTEIRO, 2007).

A eficácia do surfactante é determinada através da capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial. A tensão interfacial é a medida da energia livre existente entre duas fases, já a tensão superficial é a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (MULLIGAN, 2005). Essa eficácia pode ser medida através da Concentração Micelar Crítica (CMC), que é definida como a mínima concentração de surfactante com propriedades tensoativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas, que conferirá as propriedades de detergência e solubilização ao composto tratado (Figura 01).



**Figura 01.** Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo. Fonte: Adaptada de Monteiro 2007.

Em concentrações acima da CMC, o tensoativo aumenta a solubilidade de compostos orgânicos em água (i.e., o composto orgânico é incorporado no interior da micela); contudo, as tensões superficial e a interfacial da solução permanecem constantes. Esse parâmetro indica se o surfactante é um bom redutor de tensão superficial, e quanto menor é o valor de CMC, maior a eficiência do biossurfactante (MONTEIRO, 2007; DESAI E BANAT, 1997).

Os indicadores mais largamente utilizados para medir a atividade surfactante são os parâmetros de tensão superficial, tensão interfacial e a concentração micelar crítica (CMC). Geralmente estes indicadores são utilizados para avaliar a eficácia de um biossurfactante.

### **3.2 Biossurfactantes**

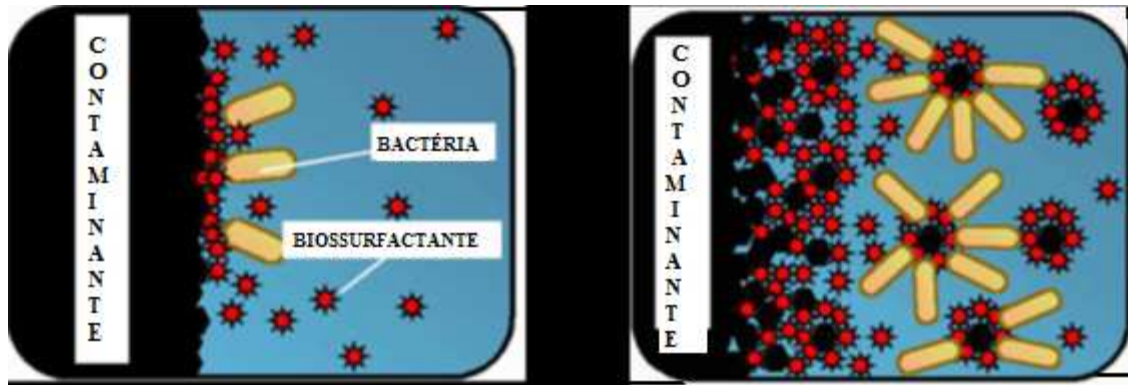
Enquanto os surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes incluem: glicolípideos, fosfolípideos, lipopeptídeos ou lipoproteínas (PIROLLO, 2006).

Os biossurfactantes são sintetizados por uma variedade de micro-organismos, apresentando diferentes estruturas químicas e propriedades surfactantes, fazendo com que apresentem diferentes funções naturais com diferentes aplicações (BARBOSA et al., 2007). Estas aplicações incluem formulações de fármacos e cosméticos, produtos alimentícios e agrícolas. Grandes volumes desses compostos são requeridos, em processos especiais de recuperação de petróleo, recuperação e proteção ao meio ambiente (THANOMSUB et al., 2006 ; SAEKI et al, 2009) como também são aplicados na flotação para remoção de íons metálicos tóxicos (ZOUBOULIS et al., 2003). Além da importância comercial e biotecnológica, os micro-organismos produzem biossurfactantes com finalidades fisiológicas, permitindo que cresçam em substratos hidrofóbicos, através da diminuição da tensão superficial, disponibilizando-os para o seu metabolismo. Admite-se também que a produção dos tensoativos esteja ligada a fatores de virulência e a formação de biofilme (STRELEC, 2006; BARBOSA, 2011).

Biossurfactantes influenciam a fisiologia microbiana em diversas atividades metabólicas tais como a mobilidade e comunicação celulares, acesso aos nutrientes, competição biológica e na patogênese em plantas e animais (PEIXOTO, 2008; BARBOSA, 2011).

A produção de biossurfactante pode ser induzida por hidrocarbonetos ou substratos insolúveis em água, porém também podem ser produzidos a partir de substratos solúveis em água, especialmente carboidratos. A produção de biossurfactante por bactérias cultivadas em

hidrocarbonetos está associada à alta densidade celular. A presença de biossurfactantes no ambiente desempenha um papel natural, aumentando a degradação de compostos hidrofóbicos, uma vez que aumentam a área superficial das gotas de óleo, permitindo o acesso de mais bactérias ao substrato, otimizando, por conseguinte, a produção de biomassa bacteriana (TONINI et al., 2010) (Figura 02).



**Fig. 02:** Imagem ilustrativa da ação dos biossurfactantes sobre o petróleo. Fonte: Silva, 2011- adaptado do site <http://www.natureswaygreen.com/bioremediation.htm>

Hidrocarbonetos e carboidratos estão envolvidos na síntese das porções hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente, das moléculas de biossurfactante. As seguintes possibilidades existem para a síntese das diferentes porções das moléculas de biossurfactantes e seu acoplamento: a) as porções hidrofóbica e hidrofílica são sintetizadas de forma independente; b) a porção hidrofílica é sintetizada constitutivamente enquanto a síntese da porção hidrofóbica é induzida pelo substrato; c) a porção hidrofóbica é sintetizada, enquanto a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato e, d) a síntese de ambas porções hidrofóbica e hidrofílica é dependente do substrato (PINTO et al., 2009).

Os biossurfactantes apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial com baixa toxicidade, alta especificidade e biodegradabilidade (ANANDARAJ et al., 2010). Possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis e ainda permitir que sua estrutura seja modificada através da engenharia genética ou por técnicas químicas e bioquímicas (KOSARIC, 1992; COLLA et al., 2003; VIEIRA et al., 2005). Outra importante propriedade do biossurfactante é a sua capacidade de apresentar atividade biológica como antimicrobianos (MUKHERJEE et al., 2006 apud SILVA, 2011).

No entanto, os biossurfactantes apresentam desvantagens associadas com a produção em grande escala devido ao alto custo. Grandes quantidades são particularmente necessárias em aplicações nos métodos especiais de recuperação de petróleo e ambientes impactados por hidrocarbonetos e derivados, tornando os biossurfactantes ainda inacessíveis economicamente. Para aperfeiçoar a produção microbiana de biossurfactante é fundamental melhorar o rendimento e a produtividade dos processos, que podem ser alcançados através de seleção apropriada das cepas microbianas, formulação adequada do meio de cultivo, processos de produção mais eficientes, uso de resíduos e co-produtos agroindustriais como substratos, bem como melhoramento genético da cepa microbiana. O uso de resíduos e/ou co-produtos de baixo valor como substratos além de equilibrar os custos gerais, combate o seu efeito poluente (KOSARIC, 1992; HABA et al., 2000; BANAT, 2000).

Os biossurfactantes podem ser liberados extracelularmente no meio de cultura ou aderidos à célula do micro-organismo (PINTO et al., 2009). A maioria é liberada no meio de cultura durante o estado estacionário ou então, na fase de crescimento exponencial (RON e ROSENBERG, 2001). Quando são excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BARBOSA et al., 2007). Alguns micro-organismos mantêm os biossurfactantes associados à parede celular, facilitando a penetração das moléculas hidrofóbicas no espaço periplasmático (KOCH et al., 1991).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados na seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes para as indústrias alimentícias e petroquímicas, em especial, na recuperação de petróleo, de hidrocarbonetos derivados do petróleo, com vantagens em relação aos surfactantes sintéticos sobre o uso em biorremediação, na extração, na emulsificação de óleos e no transporte do óleo bruto (BARBOSA et al., 2007). Na biorremediação os biossurfactantes agem na solubilização de hidrocarbonetos poluentes onde a sua solubilidade em água é baixa, dificultando a ação de bactérias degradadoras de HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). A primeira etapa para os micro-organismos degradarem esses compostos consiste em obter melhor contato da superfície celular com o óleo e em seguida transportá-los através da membrana celular (Figura 02) (CAMEORTA & SINGH, 2009). A aplicação de surfactantes pode aumentar a disponibilidade dos HAPs para os micro-organismos degradadores, auxiliando na solubilização do poluente (RON & ROSENBERG, 2001). Nos métodos especiais de recuperação de petróleo utilizando micro-organismos (MEOR) existem duas possíveis estratégias para o uso de biossurfactantes: *ex sito* e *in situ*. Enquanto a MEOR *ex sito* envolve a prévia produção de biossurfactantes antes de introduzi-

los em um reservatório, na MEOR *in situ* injeta-se micro-organismos ou estimulam aqueles previamente existentes dentro do reservatório para produzir o biossurfactante (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008).

Estudos estão sendo direcionados para o desenvolvimento de tecnologias buscando melhorar as linhagens e processos de produção, devido à vasta aplicabilidade dos biossurfactantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). A tabela 1 mostra um resumo das funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.

**Tabela 1.** Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.

<b>Funções</b>	<b>Campos de aplicações</b>
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos.
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene.
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas.
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura.
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios.
Agentes espessantes	Tintas e alimentos.
Sequestrantes de metais	Mineração.
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas.
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos.
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo.
Redutor de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos.
Dispersantes	Mistura carvão-água, calcáreo-água.
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos.
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR).

**Fonte:** Nitschke & Pastore, 2002.

Na indústria de detergentes, apesar das várias marcas disponíveis no mercado serem consideradas biodegradáveis e amparadas pela legislação em vigor, sabe-se que na verdade os componentes ativos são tensoativos obtidos por via química e não bioquímica, ou seja, o que houve foi apenas mudança do principal componente ativo alquilbenzeno sulfonato de sódio de cadeia ramificada pelo de cadeia linear o que de fato facilitou a degradação da molécula por micro-organismos, mas não tanto quanto comparado com os surfactantes naturais (BARBOSA, 2011).

Estudos mostram que biossurfactantes raminolipídeos são ótimos na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs), podendo aumentar a solubilidade de 0,7

mg/L<sup>-1</sup> para 35 mg/L<sup>-1</sup> de compostos como o fenantreno, o que resulta em um aumento significativo da biodegradação de HPAs (JACQUES et al., 2007).

Vale ressaltar que os raminolipídeos, surfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, são os biossurfactantes mais estudados (TULEVA et al., 2002). A seguir são descritos aspectos metabólicos e genéticos de raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas*.

### 3.3 Raminolipídeos

Raminolipídeos são glicolipídeos produzidos durante a fase estacionária do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (LEÃO, 2009), sendo considerado como a classe de biotensioativos mais promissores em termos de produção industrial, pois apresentam características físico-químicas e biológicas distintas e podem ser obtidos em concentrações superiores aos outros biossurfactantes, o que contribui para a difusão do uso destas moléculas, especialmente em situações onde o benefício da aplicação supera o custo da produção (COSTA, 2010).

Os raminolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25 a 30 mN/m e tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m, apresentando concentração micelar crítica (CMC) de 10 -200 mg/L (MONTEIRO, 2007). A redução da tensão interfacial que ocorre tanto em soluções aquosas quanto em misturas de hidrocarbonetos, é gerada devido à formação de micelas que permite que os hidrocarbonetos possam se solubilizar em água e a água nos hidrocarbonetos (BARBOSA, 2011). Na indústria de petróleo o biossurfactante reduz a tensão interfacial dentro dos reservatórios, mobilizando o óleo que fica retido nos poros das rochas devido ao aumento do número de capilares, com isso o biossurfactante facilita a sua remoção. Sendo assim, o biossurfactante contribui positivamente para melhorar a recuperação de petróleo reduzindo a tensão interfacial e também alterando a molhabilidade da rocha, para que a água possa deslocar mais óleo dentro do capilar da rede (RAMKRISHNA, 2008).

Segundo Santana Filho (2009) um dos fatores que influencia diretamente a produtividade de raminolipídeos é a relação carbono-nitrogênio (C/N), entretanto, não existem muitos estudos envolvendo esta variável. Valores de relação C/N de 18 (GUERRA-SANTOS et al., 1984), 10 (ABOUSEOUD et al., 2008), 20 (RAZA et al., 2007) e 55 (MONTEIRO, 2007) são reportados na literatura. Essa grande variação pode ser resultado de diversos fatores, como da cepa de *P. aeruginosa* utilizada, tipo de fonte de carbono e nitrogênio. Alguns autores demonstram haver uma linearidade entre aumento da relação C/N

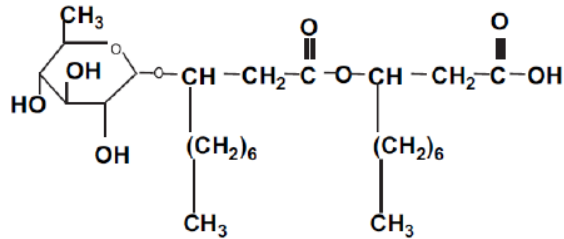
e produção de raminolipídeos, enquanto outros citam a existência de uma relação inversa, ou seja, um aumento da produtividade de raminolipídeos com a diminuição da relação C/N (GUERRA-SANTOS et al., 1984; ARINO et al., 1996). Estudo feito por Mulligan & Gibbs (1989 apud BARBOSA, 2011), correlacionou a produção de raminolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* e a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio, utilizando fontes orgânicas e inorgânicas desde elemento. Os resultados demonstraram que a produção de raminolipídeo é ativada sob condições de limitação de nitrogênio. Segundo Guerra-Santos e colaboradores (1984) as fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e nitratos) são as mais utilizadas, por serem reportadas como melhores que as fontes orgânicas como extrato de levedura (GUERRA-SANTOS et al., 1984). Maneerat (2005), também relatou que a produção de biosurfactante geralmente ocorre quando a fonte de nitrogênio é esgotada no meio de cultura, durante a fase estacionária de crescimento celular. As condições limitantes de nitrogênio provoca o declínio das atividades específicas de NAD e isocitrato desidrogenase NADP dependente que catalisa a oxidação de isocitrato a 2-oxoglutarato no ciclo do ácido cítrico. Com a redução da atividade desta enzima, ocorre acúmulo de isocitrato levando ao acúmulo de citrato no mesossomo. Citrato e isocitrato são então transportados para o citosol, onde o citrato é eliminado pela enzima citrato sintase formando acetil-CoA que é o processador da síntese de ácidos graxos e, portanto, a produção de biosurfactante aumenta (OKOLIEGBE & AGARRY, 2012).

Entretanto mesmo sendo um fator limitante para que a produção de raminolipídeo ocorra, a fonte de nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas estruturais e enzimas, e, portanto, fundamental para o crescimento celular e a manutenção da maquinaria enzimática (MONTEIRO, 2007 apud SANTOS, 2003).

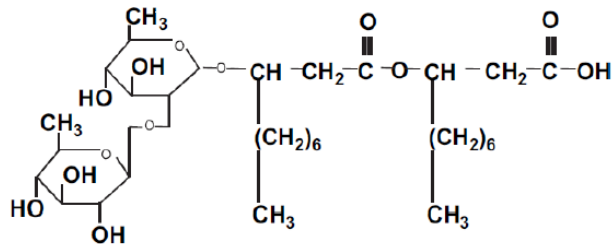
### **3.3.1 Estrutura e Síntese do Raminolipídeo**

Os raminolipídeos apresentam em sua estrutura uma ou duas moléculas de raminose ligadas a moléculas de ácido  $\beta$  hidroxidecanoico. As duas principais moléculas de raminolipídeos produzidas por *P. aeruginosa* são raminosil -  $\beta$  - hidroxidecanoil -  $\beta$  - hidroxidecanoato (mono-raminolipídeo) (Figura 03 a) e raminosil - raminosil -  $\beta$  - hidroxidecanoil -  $\beta$  - hidroxidecanoato (di-raminolipídeo) (Figura 03 b) (LEÃO, 2009 ; MULLIGAN, 2005).

a)



b)



**Fig. 03:** Estruturas das moléculas de mono-raminolipídeo (a) e di-raminolipídeo (b) produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Mulligan, 2005).

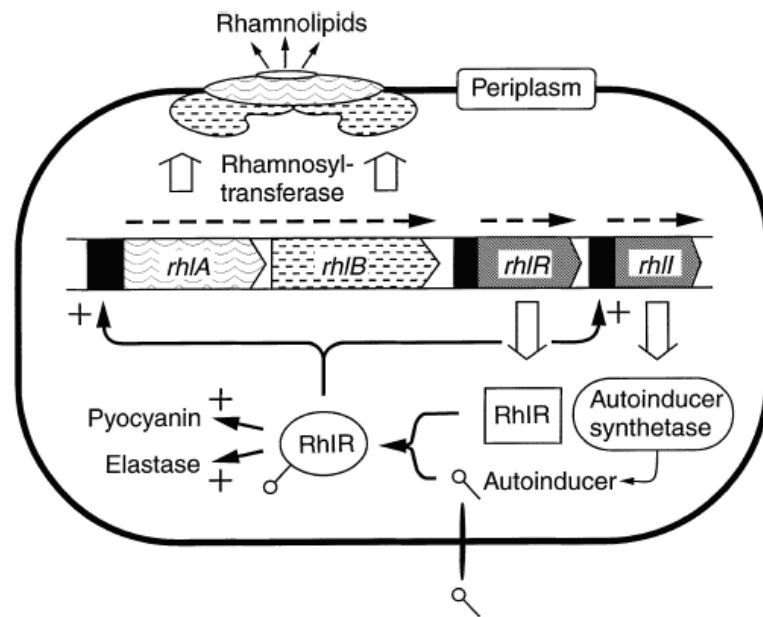
Os raminolipídeos foram descritos pela primeira vez, por Bergstrom e colaboradores (1946), em seguida Jarvis e Johnson, 1949, descreveram o composto e, em 1963, foi proposta, pela primeira vez uma via biossintética para síntese de raminolipídeos (CHA et al., 2008 apud PEIXOTO, 2008) (Fig. 04). Os primeiros genes associados à biossíntese de raminolipídeos foram caracterizados nos anos de 90 (OCHSNER, et al., 1994a ; OCHSNER, et al., 1994b ; OCHSNER e REISER, 1995), porém só foi obtido o quadro completo desses genes recentemente (CAMPOS-GARCIA et al., 1998; RAHIM et al., 2001; DEZIEL et al., 2003).

A síntese destes compostos envolve reações de transferência sequencial de grupos raminosil, cada uma catalisada por uma raminosil transferase específica. Mono-raminolipídeos são sintetizados pela ação de raminosil transferase 1 (Rt 1), com a desoxi-timidina-difosfo-L-raminose agindo como doador de raminosil e  $\beta$  - hidroxidecanoil -  $\beta$  - hidroxidecanoato agindo como receptor. Já os di- raminolipídeos são sintetizados pela raminosil transferase 2 (Rt 2) a partir de desoxi-timidina-difosfo-L-raminose agindo como doador e mono-raminolipídeos como receptores (LEÃO, 2009). A expressão dos genes envolvidos com a produção de mono e di-raminolipídeos é coordenadamente regulada em nível transcricional, envolvendo dois sistemas *quorum sensing*, sendo eles o *las* e o *rhl* (MAIER e CHAVÉS, 2000). Estes sistemas estão interligados de maneira hierárquica, e o sistema *las* controla o sistema *rhl* em ambos os níveis: transcricional e traducional (PESCI et al., 1997).



O *quorum sensing* é a resposta presente em uma ampla gama de bactérias, onde é caracterizado pela produção de compostos difusíveis autoindutores, que, em altas densidades bacterianas, interagem e ativam reguladores da transcrição. Em *P. aeruginosa* dois autoindutores que medeiam reguladores transcricionais têm sido descrito, que são N – (3-oxododecanoil) homoserina lactona (3O-C12-HSL) ou PAI-1 e N-butiril-homoserina lactona (C4-HSL) ou PAI-2. O sistema *las* consiste de um regulador de transcrição, LasR, e sua molécula sinalizadora, N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona (3O-C12-HSL), sintetizada por uma acil homoserina lactona (AHL sintase), codificada pelo gene *lasI* (PEARSON et al., 1994). O sistema LasRI regula a expressão da elastase LasA, elastase LasB, exotoxina A e protease alcalina (MAIER e CHAVÉS, 2000).

O sistema *rhl* localizado logo após os genes *rhlAB*, é composto pelos genes *rhlR* e *rhlI*. RhlR pertence a família de proteínas que funcionam como ativadores transcricionais e que é ativada por N-butiril-homoserina lactona produzido por RhlI, uma sintetase de autoindutor (Figura 02). Este autoindutor promove a ativação de RhlR, que irá ativar a expressão de *rhlAB*. Os genes *rhlA* e *rhlB* são transcritos juntos a partir de um promotor que antecede *rhlA*, assim, constituem operon que codifica uma raminosil transferase (Rt1) necessária para a produção de mono-raminolípeos. RhlR ativado também pode ser capaz de ativar a transcrição de *rpoS* (gene que codifica a RNA polimerase fator sigma), envolvidos na expressão de genes da fase estacionária do crescimento bacteriano). O RhlR depende da resposta do *quorum sensing*, inclusive para a produção de raminolípeo, onde é principalmente expresso em condições de limitações de nutrientes (MAIER e CHAVÉS, 2000; PEARSON et al., 1994; OCHSNER et al., 1994; STRELEC, 2006). Estudos mostram que a presença de RhlR e N-butiril-homoserina lactona (C4-HSL) é um condição necessária para a expressão do operon *rhlAB*, porém há uma elemento regulador que impede a expressão desse operon durante a fase exponencial de crescimento, podendo o mesmo estar relacionado com o estado nutricional da *Pseudomonas aeruginosa* (MEDINA et al., 2003).



**Fig.04:** Modelo da regulação da produção de raminolipídeos em *P. aeruginosa*. Fonte: Ochsner and Reiser, 1995.

O gene *rhlC* codifica a raminosil transferase 2 que está envolvida na produção do di-raminolipídeo, que é produzido a partir do mono-raminolipídeo. Este gene está organizado em um operon com outro gene denominado PA1131. Alguns dos mono-raminolipídeos produzidos são secretados diretamente da célula, enquanto uma parte dele é transformado pelo C em di-raminolipídeo pela transferência de uma porção raminosil, usando desoxi-timidina-difosfo-L-raminose (TDP-l-raminose) como doador. Mono e di-raminolipídeo são sintetizados na face citoplasmática da membrana interna antes de serem transportados para o meio extracelular (RAHIM et al., 2001).

### 3.4 Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* compreende um táxon de organismos muito versáteis metabolicamente, capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos simples ou complexos. Conseqüentemente, eles estão distribuídos por solos e água, sendo importantes como patógenos de plantas, animais e humanos, com algumas cepas relacionadas à promoção de crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógeno (ZAGO et al., 2000).

As espécies do gênero *Pseudomonas* são bastonetes Gram negativos, de tamanho médio com aproximadamente 1,5-5,0 x 0,5-1,0 µm. São aeróbias, oxidativas, oxidase e catalase positivas, sendo a maioria móvel, através de um ou vários flagelos polares (GOMES, 2008). A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria aeróbia que deriva sua energia de

processos oxidativos de carboidratos ao invés de fermentá-los. Pode crescer em meios de cultura contendo somente acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Além disso, embora sendo um aeróbio, ela pode crescer anaerobicamente utilizando o nitrato como receptor final de elétrons (SIQUEIRA, 2002).

*P. aeruginosa* comumente habita o solo, água e vegetais, e faz parte da microbiota normal do ser humano, podendo ser encontrada na pele, garganta e nas fezes de indivíduos saudáveis. Esta espécie tem recebido atenção pela frequência com que está relacionada a doenças em pacientes com comprometimento imunológico, acompanhado de procedimentos invasivos, queimaduras e feridas operatórias, que se tornam porta de entrada para esta espécie (MATA e ABEGG, 2007).

Produz diversos fatores de virulência, como a exotoxina, exoenzimas, piocianina, raminolípídeo e lipopolissacarídeo, que são os principais determinantes de virulência na infecção aguda. Na infecção crônica, *P. aeruginosa* formam biofilmes que, em muitos casos, aumentam drasticamente a resistência bacteriana aos tratamentos com antibióticos e aumentam a resposta imune do hospedeiro (DONG et al., 2008).

A resistência a diferentes antimicrobianos pode ser intrínseca, devido à baixa permeabilidade de sua membrana e a capacidade de formar biofilme, ou adquirida pela associação, no solo, com micro-organismos naturalmente produtores de antibióticos. Devido à sua presença em uma multiplicidade de ambientes, pode carrear plasmídios e genes que lhe conferem multi-resistência. Por tal razão, se constitui em um dos paradigmas da resistência bacteriana, pois é uma bactéria para a qual facilmente podem confluir todos os mecanismos de resistência (MAIA et al., 2009).

Além da característica intrínseca de apresentar baixo nível de sensibilidade aos antimicrobianos, diversos mecanismos de resistência têm sido identificados em *P. aeruginosa*, como hiper-expressão de bombas de efluxo, produção de  $\beta$ -lactamases, perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, etc. Frequentemente, isolados de *P. aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem) (FUENTEFRÍA et al., 2008).

No ambiente os papéis desempenhados por *Pseudomonas* incluem a biodegradação de compostos naturais e xenobióticos, promotores de crescimento de plantas, patógenos de plantas (PEIXOTO, 2008), e biorremediação de áreas impactadas com óleo cru, que utiliza micro-organismos capazes de reduzir ou eliminar contaminantes. Entretanto, a técnica de biorremediação em solos contaminados com óleo cru sofre limitação devido ao baixo nível de

disponibilidade dos hidrocarbonetos (baixa solubilidade em água, alta fixação sobre a matriz do solo e pouca transferência dos poluentes absorvidos da fase sólida para a fase aquosa). Dessa forma, a utilização de um biossurfactante pode minimizar estes problemas e aumentar os índices de biodegradação de óleo cru (MILLIOLI & SANTOS, 2003).

O gênero *Pseudomonas* é capaz de utilizar diferentes substratos, como glicerol, manitol, frutose, glicose, n-parafinas, e óleos vegetais, para produzir biossurfactantes do tipo raminolipídeo (ABOUSEOUD et al., 2008). Entretanto, a produção de raminolipídeo aumenta em condições de estresse, como a privação de nutrientes e exaustão de nitrogênio, mesmo em baixa densidade celular (REIS et al., 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* produz raminolipídeos, que apresentam notáveis características químicas e físicas, fazendo com que estes compostos sejam alvos atraentes para cientistas e empresários. A regulação da biossíntese de raminolipídeos envolve um complexo de genes que tem sido objeto de um número crescente de estudos, e mesmo assim, representa um desafio para a sua produção industrial. Os fatores regulatórios incluem proteínas do sistema de sensoriamento populacional (do inglês *quorum sensing* - QS) e respostas ambientais, e sistemas globais de regulação dentro de fisiologia bacteriana basal, agindo em nível transcricional ou pós-transcricional (REIS et al., 2011). Bactérias usam o QS para regular uma série de fenótipos como formação de biofilmes, bioluminescência, produção de antibióticos e expressão de fatores de virulência (CAMILI & BASSLER, 2006).

O sucesso da produção de raminolipídeo depende de cepas com boa produtividade e da necessidade de substratos de baixo custo. Substratos alternativos têm sido sugeridos para produção de biossurfactante, barateando o custo e aperfeiçoando o processo tecnológico de produção (HABA et al., 2000).

### **3.5 Glicerina Bruta**

A utilização de biodiesel como combustível já é uma realidade em nível mundial, sendo um mercado em crescimento devido à sua contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos, e como fonte de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo (DELATORRE et al., 2011). Os bicombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa renovável e ambientalmente segura, podendo o Brasil tornar-se ao mesmo tempo o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel, uma vez que possui grande disponibilidade de matéria-prima oleaginosa e um crescimento contínuo na indústria de óleos vegetais e do etanol (SILVA et al., 2009). Porém o crescimento da

produção de biodiesel tem gerado um grande excedente de glicerina, originando um enorme problema ambiental. Em geral, 10% da massa do produto da reação de transesterificação é representada pela glicerina bruta que apresenta impurezas como: água, metanol e material orgânico não-glicerol, o que lhe confere um baixo valor comercial (CUBAS et al., 2010). Conforme dados da ANP, no ano de 2010 a quantidade de biodiesel produzida em todo território brasileiro foi de 2.397.272 m<sup>3</sup>, enquanto que somente no estado do Rio Grande do Sul foram produzidos cerca de 605,998 m<sup>3</sup>. Considerando que cerca de 10% do biodiesel produzido corresponde a glicerina, quantidades apreciáveis de glicerina residual são geradas (LADEIRA et al., 2011), com isso torna-se necessário a busca por estratégias biotecnológicas para o reaproveitamento da glicerina bruta com o objetivo de gerar produtos de maior valor agregado.

A glicerina é considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas, sendo um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas (DILLIS et al., 1980; GANCEDO et al., 1968). A utilização da glicerina bruta na produção de biossurfactante ramnolipídeo tende a contribuir para redução do custo na sua produção uma vez que, devido ao aumento da produção de biodiesel o preço da glicerina tem diminuído cada vez mais, além disso, é uma alternativa interessante para reduzir o excedente cada vez maior de glicerina, que de outra forma poderia causar impacto sobre o meio ambiente, pois segundo Chávez (2008) grande quantidade de efluentes contendo glicerol é descartado no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando assim os problema e riscos ambientais.

### **3.6 Aspectos econômicos**

A economia é frequentemente o gargalo dos processos biotecnológicos, especialmente para a produção de biossurfactantes. O sucesso da produção depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de materiais renováveis e de baixo custo que resulta numa redução de 10-30% do custo total (PIROLLO, 2006).

Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para produção de: novos antibióticos e agentes terapêuticos; probióticos; produtos químicos; enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas; biorremediação de poluentes; biolixiviação e recuperação de minério (CANHOS e MANFIO, 2002 apud PEIXOTO, 2008). Além destes processos biotecnológicos podemos incluir como produto o biossurfactante, que pode ser produzido utilizando procedimentos e substratos relativamente baratos e simples,

assim a otimização do meio de cultivo e do processo como um todo é a chave da viabilidade econômica para a produção de biossurfactantes (LOBATO et al., 2003 apud STRELEC, 2006). Durante as últimas décadas, o interesse por surfactante de origem biológica tem crescido o que acarretou no aumento das pesquisas em produzir biossurfactantes a um custo compatível, quando comparado aos surfactantes derivado de produtos petroquímicos (HEYD et al., 2008).

A vantagem mais importante dos biossurfactantes, quando comparados aos sintéticos, é que são ecologicamente mais aceitos, devido a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade na natureza (DELEU et al., 2004 apud PEIXOTO, 2008), sendo tão eficientes quanto os surfactantes químicos e, para certas aplicações, eles podem ter inúmeras vantagens, justamente por apresentarem grande diversidade química e de propriedades, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior seletividade, atividade sob condições extremas de pH e salinidade, e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (DESAI e BANAT, 1997).

### **3.7 Real Time PCR**

O estudo da expressão gênica através do PCR em tempo real tem sido cada vez mais difundido na comunidade científica em virtude da praticidade e por levar a uma avaliação mais precisa do perfil de mudança na expressão no momento em que está sendo executado. A análise da expressão gênica têm sido importante para monitorar respostas biológicas a diversos estímulos, assim como para quantificar um determinado gene importante na produção de uma determinada molécula.

A capacidade de medir simultaneamente a expressão de genes é um sistema analítico poderoso, e a disponibilidade de novas tecnologias para esse fim tem fornecido muitas novas estratégias de estudo da resposta gênica (STOLF, 2007).

A análise da expressão gênica inclui a quantificação precisa de RNAm sendo expresso em diferentes situações, como estresses por temperatura, diferentes estágios de desenvolvimento, diferentes células ou tecidos. Algumas técnicas são utilizadas para estimar a quantidade de RNAm, como “Northern blotting”, RPA (“Ribonuclease Protection Assay”), PCR em Tempo Real (RT qPCR), e Microarranjos (SCHENA et al., 1995; SUZUKI et al., 2000 apud STOLF, 2007). Dois desses métodos desenvolvidos para mensurar os transcritos são frequentemente aplicados. A técnica de microarranjos permite a análise em paralelo de milhares de genes em duas populações de RNA marcados (SCHENA et al., 1995), enquanto o PCR em Tempo Real fornece a mensuração simultânea da expressão gênica em diferentes

amostras para um número limitado de genes, e é especialmente desejável quando apenas um pequeno número de células está disponível (HEID et al., 1996; ALMEIDA et al., 2010). Ambas as técnicas têm a vantagem da velocidade e do alto grau de automação potencial quando comparadas a métodos tradicionais de quantificação, como as análises de Northern blot e Ensaio de Proteção de Ribonuclease (RPA) (ALMEIDA et al., 2010).

O PCR em tempo real é a técnica mais utilizada por ser mais precisa mais rápida e de baixo custo (BUSTIN, 2000). Este tem se tornado um método padrão para mensurar e verificar mudanças na expressão gênica através da avaliação da quantidade de mRNA. Diferentemente do PCR original a técnica de PCR em tempo real apresenta como principal importância determinar de forma rápida e exata as mudanças de expressão gênica (ALMEIDA, 2009). A técnica amplifica uma sequência alvo específica em uma amostra, em seguida, monitora o progresso de amplificação usando a tecnologia fluorescente. Durante a amplificação, a rapidez com que o sinal fluorescente atinge um limite se correlaciona com a quantidade de sequência alvo original, permitindo assim a quantificação (VALASEK et al., 2005). Os sinais de fluorescência medem os produtos obtidos a partir de Real Time-PCR durante a reação em que o número de ciclo ( $C_t$  – *Cycle threshold*) significa o ponto no tempo onde a reação cruza o limiar de detecção (*Threshold* – nível de fluorescência). Assim, a reação é detectada durante a fase exponencial e o valor  $C_T$  é proporcional ao logaritmo da concentração alvo na medida (NOVAIS et al., 2004).

O Sistema SYBR<sup>TM</sup> Green emite grande quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla-fita de maneira inespecífica, revelando qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação. O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que DNA dupla fita é gerada, em virtude da concentração do corante SYBR Green entre as cadeias de DNA geradas. A emissão de fluorescência é proporcional ao número de fragmentos de amplificação e do tamanho destes fragmentos em pares de bases. Assim a fluorescência é detectada em tempo real.

No PCR em Tempo Real a quantificação do RNAm é acompanhada pelos métodos de análises absoluta ou relativa (BUSTIN, 2000; 2002). A vantagem da quantificação relativa é que os resultados podem ser analisados pelo  $C_T$  dispensando o uso de curva padrão, o que representa um menor gasto de reagentes.

O método de quantificação relativa tem sido usado mais frequentemente. Esse método fornece comparações precisas entre diferentes tratamentos em relação à expressão gênica, onde são comparados os  $C_T$  de cada amostra e os resultados representam ordens de grandeza, como por exemplo, quantidade de transcrito comparando uma amostra com outra. Entretanto,

os resultados dependem de uma normalização para ajustar as variações nas amostras relacionadas à qualidade e quantidade do RNAm obtido (STOLF, 2007), ou seja variações experimentais, causadas por diferenças na quantidade de RNAm extraído das amostras e usado nas reações.

Geralmente, a normalização é feita utilizando genes constitutivos, ou seja, que tem expressão constante onde não são afetados por condições experimentais entre as amostras em estudo.

Genes “housekeeping” tem sido a melhor referência para a normalização da análise de expressão gênica em RT-qPCR. A expressão dos genes que codificam esses normalizadores é medida em cada amostra experimental junto com o gene alvo. Genes “housekeeping” têm sua expressão estável nas células, sendo expressos em níveis similares em diferentes tipos de células e usados para normalizar as comparações entre diferentes amostras. Entretanto, a expressão de genes “housekeeping” pode variar nos tecidos, em diferentes tipos de células ou devido a condições experimentais (BUSTIN, 2000).

A técnica do PCR em Tempo Real é uma ferramenta poderosa para quantificar ácidos nucléicos, pois permite a sua quantificação a partir de quantidades mínimas (HEID et al. 1996), além disso é uma técnica precisa, rápida e de baixo custo (BUSTIN, 2000), tornando-a vantajosa para quantificação. Sendo assim, a mesma poderá vir a ser utilizada como um método de triagem para identificar bactérias produtoras de biossurfactante, pois a partir da expressão do gene responsável pela produção desta molécula será possível identificar bactérias produtoras.



#### **4. RESULTADOS**

Os artigos a seguir, são resultados do presente trabalho e estão em processo de finalização (tradução para o inglês e adequação às normas das revistas para as quais deverão ser enviados para submeter à publicação).

## **Produção de biossurfactante utilizando glicerina bruta, uma alternativa biotecnológica sustentável.**

### **Resumo**

Os biossurfactantes têm sido objeto de estudo em diversas áreas da biotecnologia, uma vez que estes apresentam propriedades biológicas aplicáveis a várias indústrias, tais como, a farmacêutica, de petróleo, de cosméticos e de alimentos, além de serem menos tóxicos e mais facilmente biodegradáveis, apresentam maior resistência às variações de temperatura, pH e a condições de elevada salinidade quando comparados aos surfactantes sintéticos. Podem ser classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biossurfactantes poliméricos, fosfolipídeos e ácidos graxos; dentre os glicolipídeos, os mais estudados são os raminolipídeos produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Uma das alternativas para a melhoria do processo de produção em larga escala seria a redução do custo, utilizando fontes de carbono reaproveitadas, como a glicerina bruta, por exemplo. A glicerina bruta é um co-produto da fabricação de biocombustíveis, cujo preço de mercado baixa a cada dia. O reaproveitamento da glicerina pode diminuir impactos negativos sobre o meio ambiente. A possibilidade da utilização de glicerina é de grande interesse e pode ser testada como fonte de carbono alternativa para o crescimento de linhagens de *Pseudomonas*, para aumentar a produção e baratear o custo de raminolipídeos. Neste trabalho foi realizado o teste de produção em duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (CCMICS 106 e CCMICS 109). A produção foi realizada em Meio Salino Mineral (MSM) e a fonte de carbono utilizada foi glicerina comercial (GC) e glicerina bruta (GB) a 2%. A partir do cultivo livre de células foi realizado o teste indireto de produção pelo índice de emulsificação (E24) e o teste quantitativo através do método orcinol - ácido sulfúrico. O raminolipídeo extraído foi visualizado em cromatografia de papel, em placa de sílica gel 60. Foram feitas também análises da tensão superficial e da estabilidade do biossurfactante produzido. Os resultados mostraram que na linhagem CCMICS 106 não houve diferença significativa entre os meios de produção. Porém na linhagem CCMICS 109 houve uma maior produção no MSM2%GC. No MSM 2% GB as linhagens CCMICS 106 e 109 produziram 2,87 g/L e 2,31 g/L respectivamente. Já no MSM 2% GC as linhagens produziram 2,47 g/L e 3,96 g/L. A análise cromatográfica sugere que as linhagens produzem um tipo de mono-raminolipídeo. O biossurfactante produzido pelas linhagens apresentou uma redução de 60,02mN/m (MSM 2% GC-sem inóculo) para 26mN/m a 30mN/m, assim como apresentou uma boa estabilidade quanto a temperatura, salinidade e pressão. Os resultados da produção demonstram a viabilidade da utilização de glicerina bruta como substrato e como fonte alternativa de carbono de baixo custo.

**Palavras Chaves:** Biossurfactantes, Raminolipídeos, *Pseudomonas*, Glicerina bruta, Glicerina comercial.

### 4.1.1. Introdução

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (NITSCHKE & PASTORE 2002). Enquanto os surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes incluem: glicolipídeos, fosfolipídeos, lipopeptídeos ou lipoproteínas (PIRÔLLO, 2006).

Os biossurfactantes são sintetizados por uma variedade de micro-organismos, principalmente por bactérias e arqueobactérias, são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, e possuem vantagens importantes sobre os surfactantes químicos como baixa toxicidade, biodegradabilidade, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis e a capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas (COLLA et al., 2003; BARBOSA et al., 2007; ANANDARAJ et al., 2010).

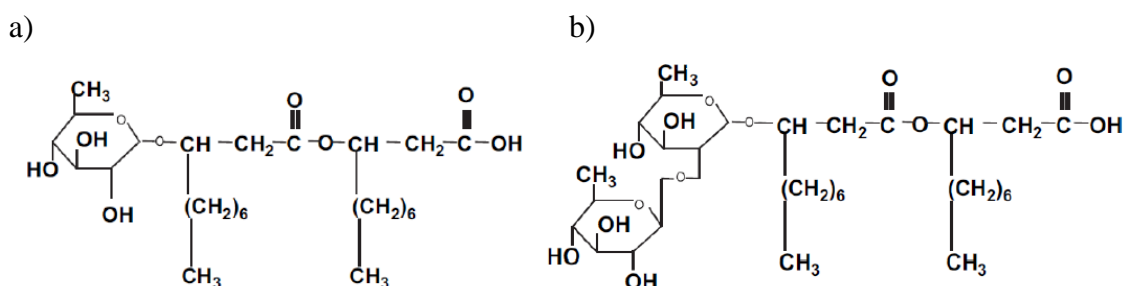
As desvantagens do raminolipídeo estão relacionadas com a produção em grande escala e baixo custo, pois dependendo da aplicação grandes quantidades são necessárias, como por exemplo, em aplicações na exploração de petróleo e biorremediação ambiental. O aperfeiçoamento da produção microbiana de biossurfactante é de grande importância para a obtenção de alto rendimento e produtividade dos processos, que podem ser atingidos através de uma formulação adequada do meio de cultivo, processos de produção mais eficientes, uso de resíduos agroindustriais como substratos, seleção e melhoramento genético da cepa microbiana. O uso de resíduos como substratos além de equilibrar os custos totais, combate o seu efeito poluente (KOSARIC, 1992; BANAT, 2000; HABA et al., 2000).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados na seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes para as indústrias alimentícias e petroquímicas, em especial, na recuperação de óleos, de hidrocarbonetos derivados do petróleo, com vantagens em relação aos surfactantes sintéticos sobre o uso em biorremediação, na extração, na emulsificação de óleos e no transporte do óleo bruto (BARBOSA et al., 2007). Como também, estudos estão sendo direcionados para o desenvolvimento de tecnologias buscando melhorar as linhagens e processos de produção, devido à vasta aplicabilidade dos biossurfactantes como, por exemplo: solubilizantes de produtos farmacêuticos e de higiene; emulsionantes e dispersantes em cosméticos, tintas, óleos e alimentos; como detergentes nos produtos de limpeza e na agricultura; sequestrantes de metais em mineração; formadores de vesículas em cosméticos e sistemas de liberação de drogas; redutor de viscosidade no transporte em tubulações,

oleodutos; como fungicida no controle biológico de fitopatógenos e agentes de recuperação especial de petróleo (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Vale ressaltar que os raminolipídeos, surfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, são os biosurfactantes mais estudados (TULEVA et al., 2002), por ser considerados como o biotensoativos mais promissores em se tratando de produção industrial, pois apresentam características físico-químicas e biológicas distintas e podem ser obtidos em concentrações superiores aos outros biosurfactantes, o que contribui para a difusão do uso destas moléculas, especialmente em situações onde o benefício da aplicação supera o custo da produção (COSTA, 2010). Os raminolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25 a 30 mN/m e tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m, apresentando concentração micelar crítica (CMC) de 10 -200 mg/L. A CMC é definida como a mínima concentração de surfactante com propriedades tensoativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas, que conferirá as propriedades de detergência e solubilização ao composto (MONTEIRO, 2007; DESAI & BANAT, 1997).

Os raminolipídeos apresentam em sua estrutura uma ou duas moléculas de raminose ligadas a moléculas de ácido  $\beta$  hidroxidecanoico. As duas principais moléculas de raminolipídeos produzidas por *P. aeruginosa* são raminosil -  $\beta$  - hidroxidecanoil -  $\beta$  - hidroxidecanoato (mono-raminolipídeo) (Figura 01 a) e raminosil - raminosil -  $\beta$  - hidroxidecanoil -  $\beta$  - hidroxidecanoato (di-raminolipídeo) (Figura 01 b) (LEÃO, 2009; MULLIGAN, 2005).



**Figura 01.** Estruturas das moléculas de mono-raminolipídeo (a) e di-raminolipídeo (b) produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Mulligan, 2005).

O gênero *Pseudomonas* é capaz de utilizar diferentes substratos, como glicerol, manitol, frutose, glicose, n-parafinas, e óleos vegetais, para produzir biosurfactantes do tipo raminolipídeo (ABOUSEOUD et al., 2008). Entretanto a produção de raminolipídeo aumenta

em condições de estresse, como a privação de nutrientes e exaustão de nitrogênio, mesmo em baixa densidade celular (REIS et al., 2011).

O sucesso da produção de raminolipídeo depende de uma alta produtividade da cepa microbiana e da necessidade de substratos de baixo custo. Substratos alternativos têm sido sugeridos para produção de biossurfactante, barateando o custo e aperfeiçoando o processo tecnológico de produção (HABA et al., 2000). A utilização da glicerina bruta na produção de raminolipídeo tende a contribuir para diminuição do custo na sua produção, sendo considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias, sendo também um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas (DILLIS et al., 1980; GANCEDO et al., 1968). Devido ao aumento da produção de biodiesel o preço da glicerina tem diminuído cada vez mais, sendo o seu uso na produção de biossurfactante uma alternativa importante para reduzir o excedente cada vez maior de glicerina, que de outra forma poderia causar impacto sobre o meio ambiente, pois segundo Chávez (2008) grande quantidade de efluentes contendo glicerol é descartado no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando assim os problemas e riscos ambientais.

#### **4.1.2. Materiais e Métodos**

##### **4.1.2.1. Micro-organismos**

Para a produção de raminolipídeo foram testadas duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (CCMICS 106 e CCMICS 109) pertencentes à coleção de cultura de micro-organismos do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de micro-organismo, do Instituto de Ciência da Saúde- ICS/UFBA.

##### **4.1.2.2. Produção do inóculo**

A solução de inóculo para a produção de raminolipídeo foi realizado em Meio Salino Mineral utilizando como fonte de carbono glicerina comercial (GC) e glicerina bruta (GB) a 2% (v/v). As amostras inoculadas no meio de produção permaneceram por 120h, a 30°C e 180rpm. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 8000rpm por 20 minutos a 10°C, e a partir do cultivo livre de células foram realizados os testes subsequentes, em triplicata.

#### 4.1.2.3. Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado utilizando 2 mL de óleo mineral e 2 mL de meio de cultivo livre de células. A mistura foi agitada em agitador tipo vortex durante 2 minutos. O índice de emulsificação foi determinado após 24 horas, de acordo com a equação descrita por Sousa (2008).

$$IE_{24} (\%) = \frac{\text{Altura emulsificada}}{\text{Altura total}} \times 100$$

A análise foi feita nos seguintes intervalos de tempo: 24h, 48h, 72h, 96h e 120h.

#### 4.1.2.4. Extração e quantificação de raminolipídeo

A determinação de raminose, uma forma direta de quantificação de raminolipídeos, foi realizada através do método orcinol-sulfúrico (SOUSA, 2008). O raminolipídeo foi extraído, separando a célula do sobrenadante através de centrifugação (8000 rpm). A extração foi feita com clorofórmio:etanol, acrescentando 0,5mL do sobrenadante em 1mL de clorofórmio:etanol (2:1 v/v). A fase orgânica (sobrenadante) foi evaporada e seca e depois ressuspensa em 0,5mL de água destilada (WANG et al., 2007). Depois da extração realizou-se a quantificação com o orcinol-ácido sulfúrico. O método consistiu em adicionar 0,9 mL desta solução a uma alíquota de 0,1 mL da amostra, seguido de aquecimento a 80°C durante 30 minutos. Após 15 minutos, determinou-se a absorvância em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys a 421 nm. A curva padrão foi obtida com soluções de raminose com concentrações conhecidas, entre 5 e 50 mg/L (SOUSA, 2008). A extração e quantificação foram realizadas com 120 horas de produção.

#### 4.1.2.5. Análise da Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada no meio de cultura livre de células utilizando um Tensiômetro (KSV- modelo Sigma) a 25°C. Como controle, utilizaram-se os meios de cultura sem inóculo nas mesmas condições. 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. Uma força adicional é exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido vai se romper, sendo então determinada a tensão superficial (KRÜSS, 1994 apud MONTEIRO 2007). A análise da tensão superficial foi realizada nos seguintes intervalos de tempo: 48h, 72h, 96h e 120h.

#### **4.1.2.6. Análises do raminolipídeo em CP**

O raminolipídeo foi visualizado por cromatografia de papel (CP), seguindo a metodologia adaptada de Wang e colaboradores (2007). A metodologia permite detectar o tipo de raminolipídeo produzido. O raminolipídeo foi visualizado em comparação com uma solução padrão de raminose (1000mg/L). A técnica consiste em pipetar 10µl de amostra extraída em uma placa de sílica gel 60. Após a secagem à temperatura ambiente, a corrida das amostras foi realizada com uma solução de Acetato de Etila : Metanol (3:1, v/v). Os componentes separados foram detectados por uma solução reveladora de ácido acético glacial: ácido sulfúrico : anisaldeído (50:1:0,05, v/v/v), a 110° C após 5 minutos (WANG et al., 2007; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008).

#### **4.1.2.7. Avaliação da estabilidade do raminolipídeo produzido**

A análise da estabilidade do raminolipídeo foi realizada utilizando o caldo livre de células, seguindo a metodologia adaptada de Piróllo (2006). O efeito da temperatura foi avaliado aquecendo-se a amostra em banho-maria a 100°C por 60 minutos e resfriando em temperatura ambiente. A estabilidade em salinidade foi feita a partir da adição de sal sobre o biossurfactante, acrescentando-se ao caldo 3,5% de NaCl, valor correspondente a salinidade marinha, e misturou-se até completa dissolução. Para análise sob pressão, colocou-se o caldo em autoclave, durante 15 minutos a 121°C e 1 atm. A análise da estabilidade em pH foi feita ajustando o caldo a pH 2,0 e pH 12. Analisaram-se possíveis alterações na tensão superficial para cada tratamento, com os seguintes intervalos de tempo: 48h (Pressão); 72h (Salinidade); 96h (Temperatura e pH).

#### **4.1.2.8. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo programa Assistat, utilizando análise de variância (a Nova) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de ter ocorrido ao acaso.

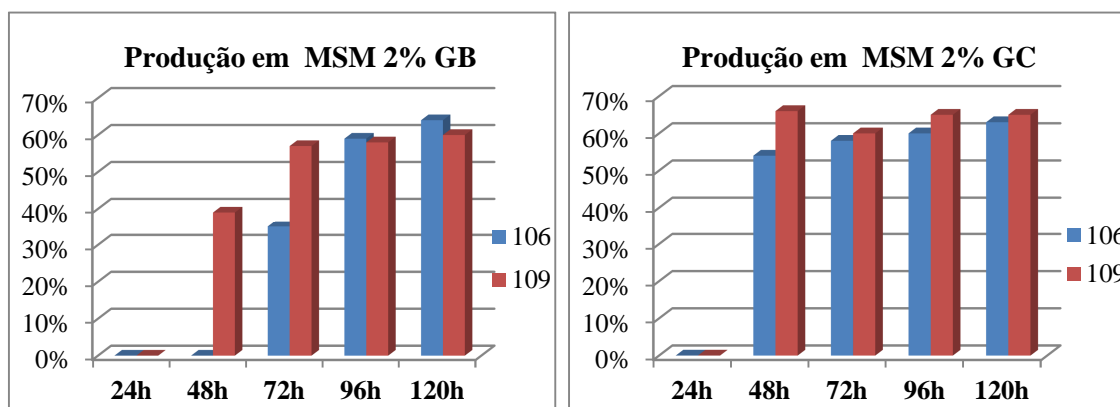
### **4.1.3. Resultados e Discussões**

#### **4.1.3.1. Índice de Emulsificação (E24)**

Os critérios utilizados para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes são a habilidade de produzir emulsificado e reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN/m, além da capacidade de estabilização da emulsão e a habilidade em manter pelo menos 50% do volume da emulsão original 24h depois da sua formação.

A partir do teste E-24 realizado foi possível observar que as linhagens testadas produziram biossurfactante em ambos meios (MSM 2% GB e MSM 2% GC). Com base nos resultados observou-se que a linhagem *CCMICS 106* iniciou a produção no MSM2%GB com 72 horas, porém no MSM2%GC a produção iniciou com 48 horas. Já a linhagem *CCMICS 109* iniciou a produção no mesmo intervalo de tempo (48 horas) em ambos meios de produção.

Com 120 horas de produção a linhagem *CCMICS 106* apresentou uma produção de biossurfactante de 64% e 60% no MSM 2%GB e no MSM2%GC, respectivamente, mostrando assim que não houve diferença significativa entre os meios de produção para esta linhagem. Na linhagem *CCMICS 109*, a produção foi de 60% e 65% nos MSM2%GB e MSM2%GC, respectivamente. Nesta linhagem também não houve diferença significativa entre os meios de produção testados.



**Gráfico 01.** Quantificação em porcentagem da produção de raminolípido através do método de índice de emulsificação.

Comparando as linhagens entre si observou-se que com 120 horas de produção no MSM 2% GB a linhagem *CCMICS 106* apresentou uma produção de biossurfactante de 64% e a linhagem *CCMICS 109* apresentou uma produção de 60%, mostrando assim que entre as linhagens também não houve diferença significativa neste meio. Porém os resultados mostraram que a linhagem *CCMICS 109* começou a produzir com 24 horas de antecedência em relação à linhagem *CCMICS 106* indicando assim, que as linhagens tiveram comportamento diferente neste meio. Apesar de não ter tido diferença significativa entre as linhagens na produção no MSM 2% GB, observou-se que devido ao fato da linhagem *CCMICS 109* ter iniciado a produção mais cedo, a mesma teve uma produção um pouco maior nos 2 primeiros intervalos de tempo testados em relação a *CCMICS 106*, porém no último intervalo de tempo a produção da *CCMICS 109* permaneceu praticamente estável



enquanto a produção da *CCMICS 106* foi um pouco maior. Algumas hipóteses foram levantadas para tal situação: 1<sup>a</sup>- a linhagem *CCMICS 109* começou a degradar o próprio raminolípido e conseqüentemente estabilizou a produção, pois ao mesmo tempo em que ela produzia ela degradava. 2<sup>a</sup> - a linhagem *CCMICS 109* começou a entrar na fase de declínio e por isso sua produção permaneceu estável nas últimas 24 horas do experimento.

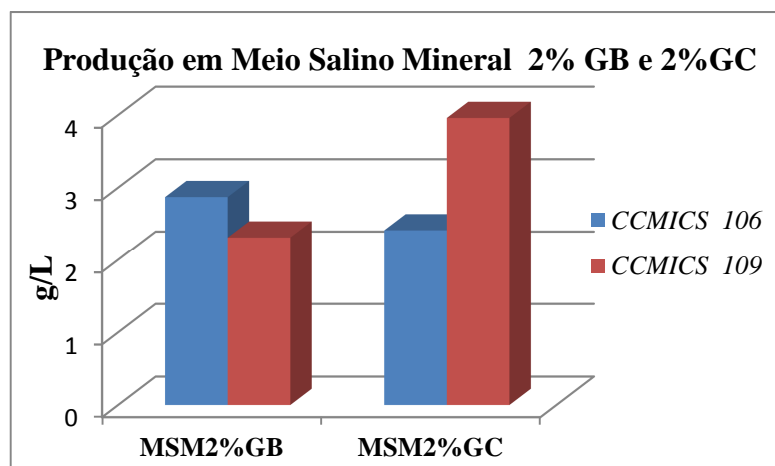
Quando comparada a produção no MSM 2% GC observou-se que ambas as linhagens tiveram o mesmo comportamento uma vez que iniciou a produção no mesmo intervalo de tempo. Os resultados indicam que também não houve diferença significativa entre as linhagens para este meio, pois a linhagem *CCMICS 106* produziu 63% de biossurfactante e a linhagem *CCMICS 109* produziu 65%, sendo  $p > 0,05$ .

Todas as amostras permaneceram com a emulsão estável por mais de 30 dias de produção.

#### 4.1.3.2. Quantificação dos raminolípídeos em g/L

Com base na quantificação de raminolípido pela técnica do orcinol : ácido sulfúrico com 120 horas de produção observou-se que as linhagens *CCMICS 106* e *CCMICS 109* produziram no MSM 2% GB 2,8g/L e 2,3g/L, respectivamente. Os resultados correspondem aos dados encontrados no teste do índice de emulsificação (E24) onde mesmo não tendo diferença significativa entre as linhagens a porcentagem foi um pouco maior para a linhagem *CCMICS 106*.

Em relação à produção no MSM 2% GC observou-se que com base na quantificação que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de produção entre as linhagens, pois a linhagem *CCMICS 106* produziu 2,4g/L e a linhagem *CCMICS 109* produziu 3,9g/L.



**Gráfico 02:** Dosagem de raminolípido pelo método orcinol : ác.sulfúrico.

Com base nos resultados apresentados no gráfico 02 observa-se que a maior produção no MSM 2% GB foi obtida pela linhagem *CCMICS 106* (2,8g/L) e no MSM 2% GC foi obtida pela linhagem *CCMICS 109* (3,9g/L).

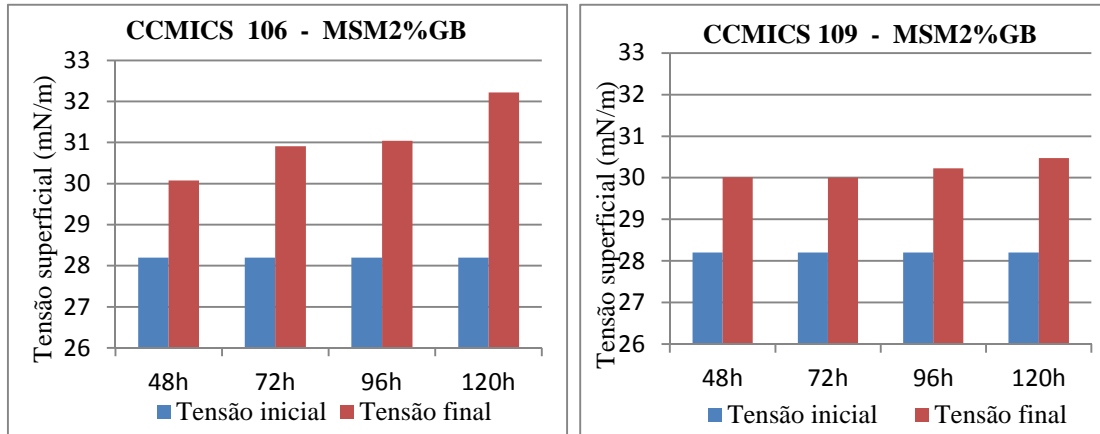
Santa Anna e colaboradores (2002) quantificaram raminolipídeo produzido pela linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PA1, utilizando glicerina comercial como fonte de carbono em concentrações de 1 a 6% (v/v) e observaram que a melhor produção foi com 3% de glicerol produzindo 2,6 g/L de raminolipídeo. Neste trabalho observou-se uma produção maior de raminolipídeo (3,9 g/L) utilizando apenas 2% de glicerina comercial. O fato da linhagem *CCMICS 109*, produzir uma maior quantidade de raminolipídeo utilizando menor quantidade da fonte de carbono em relação a *P. aeruginosa* PA1, a torna um micro-organismo promissor para a produção do raminolipídeo, não sendo descartados estudos que melhorem ainda mais esse rendimento. No entanto, estudos de viabilidade econômica devem ser efetuados visto que o glicerol comercial é muito mais caro que a GB.

Estudos mostram que uma baixa concentração de biossurfactante é suficiente para reduzir ao máximo as tensões superficial (água/ar) e interfacial (água/óleo). Segundo Monteiro (2007) a concentração necessária de raminolipídeo para se atingir a CMC está tipicamente entre 10 a 200mg/L, fato este que foi observado em nosso experimento já que a produção está dentro dos valores necessários para se atingir a CMC.

#### **4.1.3.3. Análise da Tensão superficial**

Visando analisar a eficiência do raminolipídeo produzido pelas linhagens nos meios de produção, foram efetuadas medidas da tensão superficial. A tensão superficial é a propriedade de maior importância para os agentes tensoativos, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna. A tensão superficial também diminui quando a concentração de surfactante em um solvente apolar aumenta, ocorrendo formação de micelas reversas (RUFINO et al., 2011). Nos sistemas de micelas reversas, as cabeças polares dos anfifílicos estão concentradas no interior do agregado e por esta razão formam um núcleo central hidrofílico (MANIASSO, 2001). Os gráficos 3 e 4 ilustram os valores da tensão superficial nos meios de cultivo (MSM 2% GB e MSM 2% GC). Observa-se que no meio de cultivo com 2% de GB a tensão superficial inicial (controle) apresentou maior redução em

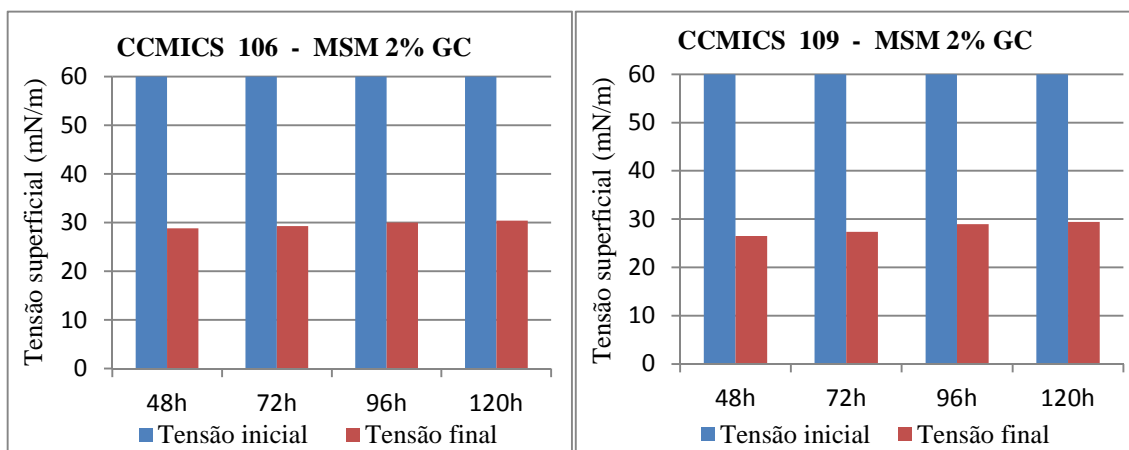
relação à tensão superficial final, ficando com 28,20 mN/m. Devido ao fato da baixa tensão superficial inicial por interferência da GB presente no meio, não foi possível observar a eficácia do biossurfactante produzido pelas linhagens neste meio de produção.



**Gráfico 03:** Análise da tensão superficial inicial e final no ensaio de produção em MSM2%GB.  
Linhagem: CCMICS 106 e CCMICS 109.

Para confirmar a ação da Glicerina bruta em reduzir a tensão do meio, foi feita uma análise em água da torneira, onde a mesma tinha uma tensão superficial de 72 mN/m e com a adição da Glicerina bruta (2%) a tensão superficial reduziu para 28,69mN/m.

No MSM 2% GC observou-se a eficiência do biossurfactante raminolípido para ambas as linhagens (CCMICS 106 e CCMICS 109). A tensão superficial inicial foi de 60 mN/m (meio de cultura sem inóculo), sendo que houve uma redução de 26 a 30mN/m entre as linhagens. Haba e colaboradores (2000), consideram bons produtores de biossurfactante aqueles micro-organismos que reduzem a atividade superficial a 40mN/m ou menos, como foi observado neste experimento em ambos os meios de produção.



**Gráfico 04:** Análise da tensão superficial inicial e final no ensaio de produção em MSM 2% GC utilizando as linhagens *CCMICS 106* e *CCMICS 109*.

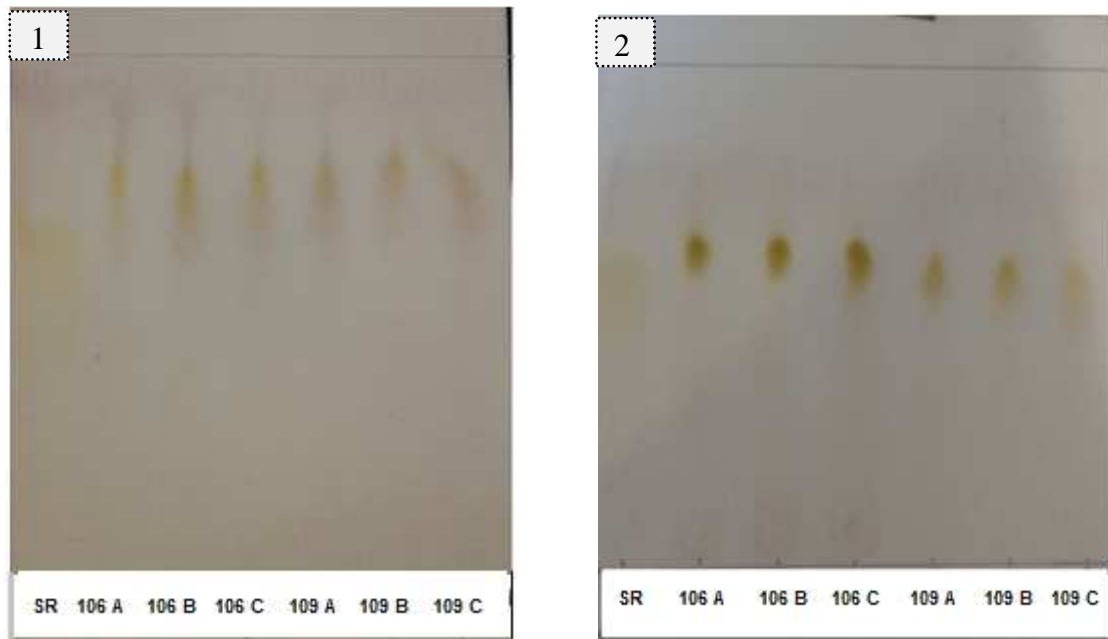
Na linhagem *CCMICS 106* com o MSM2%GC praticamente não houve diferença na redução da tensão superficial final entre os intervalos de tempo (48h, 72h, 96h e 120h). A redução da tensão superficial final foi entre 28,8 a 30,3 mN/m, sendo que a maior redução obtida por esta linhagem foi no início da produção (48h), com uma redução de 28,8mN/m. O aumento da tensão superficial de 28,8mN/m para 30mN/m pode estar relacionado com a degradação do raminolipídeo pela própria linhagem produtora, que passou a utilizar o seu produto como fonte de nutrientes.

Na linhagem *CCMICS 109* houve uma maior redução da tensão superficial, com uma variação de 26,5 e 29,4 mN/m, sendo que a maior redução também foi observada com 48 horas. A maior redução observada nesta linhagem está relacionada com a maior produção de biossurfactante medida pela produção de raminose onde, observou-se que neste meio (MSM 2% GC) a linhagem *CCMICS 109* apresentou uma maior produção (3,9 g/L). Segundo Duarte (2003), a diminuição da tensão superficial serve como uma medida indireta para determinar a produção de biossurfactante, pois os menores valores de tensão superficial coincidem com os maiores valores obtidos na concentração de raminose. Tal fato foi observado neste trabalho.

Segundo Desai e Banat (1997), a tensão superficial durante a produção de raminolipídeos por *P. aeruginosa* pode chegar a 29 mN/m, de forma que os valores mínimos de tensão superficial encontrados no presente trabalho concordam com dados relatados na literatura.

#### **4.1.3.4. Análise Cromatográfica**

A partir da análise em cromatografia de papel, foi possível observar a presença de uma única banda de raminose nas amostras corridas em sílica gel 60, ou seja, os resultados sugerem que ambas as linhagens (*CCMICS 106* e *CCMICS 109*) produzem raminolipídeo do tipo mono-raminolipídeo.



**Figura 02.** Cromatografia de camada fina (TLC) das amostras *CCMICS 106* (a, b, c) e *CCMICS 109* (a, b, c). \*SR- Solução de raminose. **1**-MSM 2% GB ; **2**-MSM 2% GC.

Mesmo sendo visualizada a presença de uma única banda de raminose, as linhagens podem vir a produzir di-raminolípeido, pois ambas apresentaram expressão do gene *rhIC* quando analisado em PCR em tempo real (dados não mostrados). O gene *rhIC* é responsável por codificar a enzima que transfere uma segunda molécula de raminose ao mono-raminolípeido, para produção do di-raminolípeido (RAHIM, et al., 2001).

#### 4.1.3.5. Estabilidade do raminolípeido

Segundo Pirollo (2006), os biossurfactantes apresentam estabilidade em condições adversas de temperatura, pressão, salinidade e pH. Foram realizados ensaios em condições de temperatura (100°C), pressão (1 atm, 121°C, 15 min), salinidade (3,5% de NaCl) e pH (2,0 e 12) com o sobrenadante livre de células para verificar a estabilidade das propriedades tensoativas nestas condições. Medidas da tensão superficial mostraram que o raminolípeido manteve-se estável mesmo após 60 minutos de aquecimento a 100°C. Em relação à pressão e salinidade também não houve mudança das propriedades tensoativas, pois a tensão superficial do biossurfactante permaneceu estável em ambas as linhagens.

**Tabela 01:** Estabilidade do Biossurfactante em mN/m – *CCMICS 106*

	Temperatura	Pressão	Salinidade
<b>MSM 2%GB</b>			
Antes do Tratamento	31,04	30,08	30,91
Depois do Tratamento	31,25	30,03	30,11
<b>MSM 2%GC</b>			
Antes do Tratamento	30,02	28,8	29,27
Depois do Tratamento	29,85	29,37	29,35

**Tabela 02:** Estabilidade do Biossurfactante em mN/m – *CCMICS 109*

	Temperatura	Pressão	Salinidade
<b>MSM 2%GB</b>			
Antes do Tratamento	30,23	30,01	30,01
Depois do Tratamento	29,44	30,17	29,35
<b>MSM 2%GC</b>			
Antes do Tratamento	28,93	26,5	27,38
Depois do Tratamento	28,86	27,33	27,33

Em estudo feito por Barros e colaboradores (2008) utilizando biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, analisou-se a estabilidade do biossurfactante a uma temperatura de 100°C por 1 hora, e observou-se também que não houve mudança significativa na atividade superficial do biossurfactante após o tratamento. Analisando a estabilidade da propriedade tensoativa sob condição de pressão e salinidade os resultados também confirmaram a estabilidade do biossurfactante neste tratamento. Segundo Barbosa (2011), os biossurfactantes apresentam tolerância à força iônica, pois não precipitam em solução salina de até 10%, enquanto que soluções de 2-3% de sal são suficientes para desativar os surfactantes químicos.

Por outro lado, os resultados da análise da estabilidade em diferentes pH mostraram uma pequena alteração nos valores, sendo assim não foi possível confirmar a estabilidade nas linhagens. A estabilidade em pH foi analisada em pH ácido e básico, comparando com os valores da tensão superficial em pH neutro. Em pH ácido (2,0) houve uma pequena redução da tensão superficial. No MSM 2% GB houve uma redução de 31 para 28mN/m na TS para a linhagem *CCMICS 106* e de 30 para 28mN/m na TS para a linhagem *CCMICS 109*. Já no MSM 2% GC houve uma redução de 30 para 27mN/m para a linhagem *CCMICS 106* e de 28 para 26mN/m na linhagem *CCMICS 109*. Observou-se início da precipitação do biossurfactante nesta escala de pH, fazendo com que a tensão superficial fosse reduzida. Em estudo feito por Kim e colaboradores (1997) que analisaram a tensão superficial em um gama de pH, observou-se que a tensão superficial permaneceu estável com pH entre 5,0 a 9,5,

porém com pH 4,0 houve um ligeiro aumento da tensão e na escala mais baixa de pH (< 4,0), a tensão superficial foi reduzida devido à precipitação do biossurfactante. Tais dados confirmam os resultados encontrados neste trabalho. Analisando a estabilidade em pH básico (12) observou-se o contrário, pois houve um pequeno aumento da tensão superficial, pois no MSM 2% GB houve uma variação de 31 para 32 mN/ na linhagem *CCMICS 106* e 30 para 31 mN/m na linhagem *CCMICS 109*. No MSM2 % GC a variação foi de 30 para 32 mN/m na linhagem *CCMICS 106* e de 28 para 30 mN/m na linhagem *CCMICS 109*. Devido ao aumento da tensão superficial não foi possível confirmar a estabilidade do biossurfactante nesta faixa de pH.

Piróllo (2006) analisou a estabilidade do biossurfactante produzido por cepa de *Pseudomonas aeruginosa* nas mesmas condições (temperatura, pressão e salinidade) e o biossurfactante permaneceu estável, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Makkar e Cameotra (1997) analisaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* cultivado por 72 horas em meio contendo sacarose como fonte de carbono e o sobrenadante foi submetido a 100°C. Observaram que após 2 horas de aquecimento o caldo contendo o biossurfactante manteve a atividade superficial de 28 a 29 mN/m.

#### 4.1.4. Conclusões

- O biossurfactante produzido e excretado pelas linhagens no meio de cultivo com 2% de glicerina comercial promoveu uma boa redução da tensão superficial. Observou-se uma redução entre 28 a 30 mN/m para a linhagem *CCMICS 106* e uma redução entre 26 a 29 mN/m para a linhagem *CCMICS 109*.
- A produção de biossurfactante pela linhagem *CCMICS 106* no meio salino utilizando a glicerina bruta como fonte de carbono não mostrou diferença significativa em relação ao meio salino utilizando a glicerina comercial, sendo assim o uso da glicerina bruta é uma alternativa biotecnológica sustentável, podendo substituir a glicerina comercial tornando o bioproduto mais barato.
- Observou-se que a utilização de glicerina bruta como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactante é viável, entretanto recomendam-se estudos mais detalhados para tentar analisar a eficiência do biossurfactante ao utilizar esta matéria-prima.

- O meio de produção suplementado com glicerina bruta a 2% demonstrou ser o mais eficiente para a linhagem *CCMICS 106*.
- A maior produção de biossurfactante foi de 3,9 g/L pela linhagem *CCMICS 109* no MSM 2% GC.
- As propriedades tensoativas foram mantidas a 100°C, pressão e salinidade em ambas as linhagens, podendo ser um biossurfactante com boa aplicabilidade em biorremediação e para aumentar o fator de recuperação de petróleo em campos maduros.
- As análises cromatográficas mostram que ambas as linhagens produzem mono-raminolípídeo, diferente dos resultados das análises de expressão gênica (Artigo 02) os quais sugerem que ambas as linhagens também podem produzir di-raminolípídeo. Dessa forma, ainda são necessários efetuar mais estudos para esclarecer esses detalhes sobre os tipos de moléculas de raminolípídeos produzidos pelas linhagens.

#### 4.1.5. Referências

ABOUSEOUD, M. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. ScienceDirect **Desalination** 223 (2008) 143–151

ANANDARAJ, B.; THIVAKARAN, P. Isolation and Production of Biosurfactant Producing Organism From Oil Spilled Soil. **Biosci Tech**, Vol 1 (3),2010,120-126

BANAT, P.I. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur** 198, Mars 2000

BARBOSA, A.P.A.; GONDIM, A.L.N.; PAZ, M.C.F. Remoção do Corante Preto Pirazol por *pseudomonas aeruginosa*. **II CONEPI** - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007

BARBOSA, S.A. **Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima**. (Tese) Renorbio - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, São Cristovão- SE 2011. Disponível em: [http://bdtd.ufs.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=64](http://bdtd.ufs.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=64)

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(4): 979-985, out.-dez. 2008.

CHÁVEZ, J. D. R. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos**. (Dissertação) São Paulo, 2008. Disponível em: [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde.../BID08009.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde.../BID08009.pdf)

COLLA, L.M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Revista Veter**, Rio Grande, 13: 85-103, 2003.



COSTA, S.G.V.A.O. **Estudo da Produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: rhamnolípideos e Polihidroxicanoatos (PHAs)**. (Tese) Rio Claro/SP 2010. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br>

DILLIS, S.S. et al. Carbohydrate Transport in Bacteria. **Microbiological reviews**, Sept. 1980, p. 385-418. Vol. 44, No. 3

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

DUARTE, M. S. **Caracterização de bactérias produtoras de rhamnolípideos isoladas de poços de petróleo**. (Dissertação) Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Recife, 2003. Disponível em: [www.liber.ufpe.br/teses/arquivo/20031030145026.pdf](http://www.liber.ufpe.br/teses/arquivo/20031030145026.pdf)

GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **European Journal of Biochemistry**, v.6, n.2, p. 165-172, 1968.

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology** 2000, 88, 379–387

KIM, H. et al. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Vol. 84, Nº1, 41-46. 1997

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & Appl. Chern.**, Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737, 1992.

LEÃO, B.A. **Agentes Inibidores da Atividade Metabólica e do Processo de Adesão de *Desulfotomaculum nigrificans* em Superfície de Aços Inoxidável**. (Dissertação) UFV-Viçosa, 2009. Disponível em: [http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde\\_arquivos/36/TDE-2010-03-17T061631Z-2164/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/36/TDE-2010-03-17T061631Z-2164/Publico/texto%20completo.pdf)

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 18, p. 37-42, 1997.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 87-93, 2001.

MONTEIRO, S.A. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. UFPR, 2007. (Tese) Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/11333/SAFI%20AMARO%20MONTEIRO.pdf;jsessionid=02600E587273588D38A30761AEE971FA?sequence=1>

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution** 133 (2005) 183–198

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PIROLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** UNESP, Rio Claro 2006.(Dissertação) Disponível em: [http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Maria-Paula-Santos-Pirollo\\_PRH05\\_UNESP\\_M.pdf](http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Maria-Paula-Santos-Pirollo_PRH05_UNESP_M.pdf)

PORNSUNTHORNTAWEE, O. et al. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal** 42 (2008) 172–179.

RAHIM, R. et al. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnolipid synthase 2, and enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, 2001, 40(3), 708-718

REIS, R.S. et al. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. **Bioresource Technology** 102 (2011) 6377-6384.

RUFINO, R.D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011)

SANTA ANNA, L.M. et al. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 159-166, 2002.

SOUSA, J.R. **Produção de Biossurfactantes a Partir da Glicerina Obtida da Produção de Biodiesel.** UFC, 2008. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp070273.pdf>

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 356-360, 2002.

WANG, Q. et al. Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 98, No. 4, November 1, 2007

## Bioprospecção de genes relacionados com a produção de biossurfactante raminolipídeos

### Resumo

Os biossurfactantes são sintetizados por uma variedade de micro-organismos, principalmente por bactérias e arqueas. São capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, e possuem vantagens importantes sobre os surfactantes químicos, pois além de serem menos tóxico e mais biodegradáveis, apresentam maior resistência às variações de temperatura, pH e a condições de elevada salinidade. Os biossurfactantes mais estudados são os raminolipídeos produzidos por bactéria do gênero *Pseudomonas*. Os raminolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25 a 30 mN/m e tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m, apresentando concentração micelar crítica (CMC) de 10 -200 mg/L. Devido a grande importância biotecnológica dos raminolipídeos, este trabalho teve como objetivo investigar a produção de raminolipídeo em duas linhagens de *Pseudomonas* (*CCMICS 106* e *CCMICS 109*), verificando a similaridade da expressão gênica entre dois meios de produção (MSM2%GB e MSM2%GC) em diferentes intervalos de tempo. Foi realizada a quantificação de raminolipídeo através do método orcinol-ácido sulfúrico e análise da expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela produção de raminolipídeo, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Os resultados mostraram que no MSM2%GB a linhagem *CCMICS 106* apresentou uma maior produção, assim como apresentou também uma maior expressão do gene *rhlAB* que constitui o **operon** responsável pela produção de raminolipídeo. No MSM2%GC a linhagem *CCMICS 109* apresentou uma maior produção, porém neste meio de produção a expressão do gene *rhlAB* foi mais baixa, indicando assim que a mínima expressão deste gene no MSM2%GC foi suficiente para produzir uma maior quantidade de raminolipídeo.

**Palavras Chaves:** Biossurfactante, Raminolipídeo, *Pseudomonas*, PCR em tempo real, Expressão gênica.

#### 4.2.1. Introdução

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por diferentes micro-organismos, particularmente por bactérias, que apresentam moléculas anfipáticas, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas (DESAI et al., 1997). São de grande interesse industrial, em decorrência do seu amplo espectro de aplicação e das suas grandes vantagens em relação aos surfactantes químicos. Algumas delas são: alta biodegradabilidade; baixa toxicidade; biocompatibilidade e digestibilidade, o que permite sua aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos para alimentos. Sua produção pode ser econômica, dependendo do biossurfactante, podendo ser produzido a partir de resíduos industriais e co-produtos, sendo de particular interesse para produção em larga escala relacionada à utilização em tecnologias de petróleo. Os biossurfactantes também podem ser utilizados no controle de derramamento de petróleo, desintoxicação de efluentes industriais, e em biorremediação de solo contaminado (KOSARIC, 1992; COLLA et al., 2003; VIEIRA et al., 2005).

No que diz respeito às desvantagens, um dos grandes problemas está relacionado com o custo que pode ser elevado para a produção em larga escala. Grandes quantidades são particularmente necessárias em aplicações na indústria de petróleo e ambiental. Para aperfeiçoar a produção microbiana de biossurfactante é fundamental a obtenção de altos rendimentos e produtividade nos processos, que podem ser atingidos através de uma formulação adequada do meio de cultivo, processos de produção mais eficientes, uso de resíduos agroindustriais como substratos e melhoramento genético da cepa microbiana. O uso de resíduos como substratos além de equilibrar os custos globais, apresenta a particularidade de combater o efeito poluente de tais resíduos (KOSARIC, 1992; BANAT, 2000; HABA et al., 2000).

Os raminolipídeos surfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, são os biossurfactantes mais estudados (TULEVA et al., 2002). São capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25 a 30 mN/m e tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m, apresentando concentração micelar crítica (CMC) de 10 -200 mg/L. A CMC é definida como a mínima concentração de surfactante com propriedades tensioativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas, que conferirá as propriedades de detergência e solubilização ao composto (MONTEIRO, 2007).

Os raminolipídeos podem ser produzidos por *Pseudomonas* a partir de diferentes substratos, como glicerol, manitol, frutose, glicose, n-parafinas, e óleos vegetais

(ABOUSEOUD et al., 2008). Apresentam em sua estrutura uma ou duas moléculas de raminose ligadas a moléculas de ácido  $\beta$  hidroxidecanoico. As duas principais moléculas de raminolipídeos produzidas por *P. aeruginosa* são mono-raminolipídeo e di-raminolipídeo. A síntese destes compostos envolve reações de transferência seqüencial de grupos raminosil, cada uma catalisada por uma raminosil transferase específica. Mono-raminolipídeos são sintetizados pela ação de raminosil transferase 1 (Rt 1), com a desoxi-timidina-difosfo-L-raminose agindo como doador de raminosil e  $\beta$  - hidroxidecanoil -  $\beta$  - hidroxidecanoato agindo como receptor. Já os di- raminolipídeos são sintetizados pela raminosil transferase 2 (Rt 2) a partir de desoxi-timidina-difosfo-L-raminose agindo como doador e mono-raminolipídeos como receptores (LEÃO, 2009). A expressão dos genes envolvidos com a produção de mono e di-raminolipídeo é coordenadamente regulada em nível transcricional, envolvendo dois sistemas *quorum sensing*, sendo eles o *las* e o *rhl* (MAIER e CHAVÉS, 2000).

O sistema *las* consiste de um regulador de transcrição, *LasR*, e sua molécula sinalizadora, N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona (3O-C12-HSL), sintetizada por uma acil homoserina lactona (AHL sintase), codificada pelo gene *lasI* (PEARSON et al., 1994). O sistema *LasRI* regula a expressão da elastase *LasA*, elastase *LasB*, exotoxina A e protease alcalina (MAIER e CHAVÉS, 2000). O sistema *rhl* localizado logo após os genes *rhlAB*, é composto pelos genes *rhlR* e *rhlI*. *RhlR* pertence a família de proteínas que funcionam como ativadores transcricionais e que é ativada por N-butiril-homoserina lactona (C4-HSL) produzido por *RhlI*, uma sintetase de autoindutor. Este autoindutor promove a ativação de *RhlR*, que irá ativar a expressão de *rhlAB*. Os genes *rhlA* e *rhlB* são transcritos juntos a partir de um promotor que antecede *rhlA*, assim, constituem o operon que codifica uma raminosil transferase (Rt1) necessária para a produção de mono-raminolipídeos. *RhlR* ativado também pode ser capaz de ativar a transcrição de *rpoS* (gene que codifica a RNA polimerase fator sigma), envolvidos na expressão de genes da fase estacionária do crescimento bacteriano). O *RhlR* depende da resposta do *quorum sensing*, inclusive para a produção de raminolipídeo, onde é principalmente expresso em condições de limitações de nutrientes (MAIER e CHAVÉS, 2000; PEARSON et al., 1994; OCHSNER et al., 1994; STRELEC, 2006).

O gene *rhlC* codifica a raminosil transferase 2 que está envolvida na produção do di-raminolipídeo, que é produzido a partir do mono-raminolipídeo. Este gene está organizado em outro operon. Alguns dos mono-raminolipídeos produzido são secretados diretamente da célula, enquanto outra parte será transformada pelo C em di-raminolipídeo pela transferência

de uma porção raminosil, usando desoxi-timidina-difosfo-L-raminose (TDP-l-raminose) como doador. Mono e di-raminolipídeo são sintetizados na face citoplasmática da membrana interna antes de serem transportados para o meio extracelular (RAHIM et al., 2001).

A análise da expressão dos genes responsáveis pela produção de raminolipídeo inclui a quantificação precisa de RNAm sendo expresso em diferentes situações. A técnica do PCR em Tempo Real é uma ferramenta poderosa para quantificar ácidos nucleicos, pois permite a sua quantificação a partir de quantidades mínimas (HEID et al. 1996), além disso é uma técnica precisa, rápida e de baixo custo (BUSTIN, 2000), tornando-a vantajosa para quantificação.

Este trabalho teve como objetivo investigar a produção de raminolipídeo em duas linhagens de *Pseudomonas*, verificando a similaridade da expressão gênica entre dois meios de produção com glicerina bruta e glicerina comercial em diferentes intervalos de tempo.

#### **4.2.2. Materiais e Métodos**

##### **4.2.2.1. Indução Gênica e Produção do Raminolipídeo**

As linhagens de *Pseudomonas* testadas foram *CCMICS 106* e *CCMICS 109* pertencentes à coleção de cultura de micro-organismo do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de micro-organismo, do Instituto de Ciência da Saúde- ICS/UFBA. O inóculo das linhagens para a produção de raminolipídeo foi realizado em Meio Salino Mineral adaptado de Bodour e Miller-Maier (1998) utilizando como fonte de carbono glicerina comercial (GC) e glicerina bruta (GB) a 2% (v/v). As amostras inoculadas no meio de produção permaneceram por 120h, a 30°C e 180rpm. A quantificação do raminolipídeo produzido foi analisada com 120h e a extração de RNA para análise da expressão gênica foi realizada em três intervalos de tempo (0h, 48h, 120h) durante a produção.

##### **4.2.2.2. Extração e quantificação do raminolipídeo**

O raminolipídeo foi extraído, separando a célula do sobrenadante através de centrifugação (8000 rpm). A extração foi feita com clorofórmio:etanol, acrescentando 0,5mL do sobrenadante em 1mL de clorofórmio:etanol (2:1 v/v). A fase orgânica (sobrenadante) foi evaporada e seca e depois ressuspensa em 0,5mL de água destilada (WANG et al., 2007). Depois da extração realizou-se a quantificação com o orcinol-ac.sulfúrico. O método consiste em adicionar 0,9 mL desta solução a uma alíquota de 0,1 mL de amostra, seguido de aquecimento a 80 °C durante 30 minutos. Após 15 minutos, determinou-se a absorbância em

espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys a 421 nm. A curva padrão foi obtida com soluções de ramniose com concentrações conhecidas, entre 5 e 50 mg/L (SOUSA, 2008). A análise estatística foi realizada pelo programa Assistat, utilizando análise de variância (a Nova) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.2.2.3. Análise da expressão gênica

As amostras de RNAs foram extraídas utilizando o protocolo de extração Trizol adaptado de Silveira (2010). As amostras de RNA foram tratadas com DNase (DNA-free) para remoção de contaminantes de DNA sendo visualizadas em eletroforese. Além da eletroforese, a ausência de DNA genômico nos extratos de RNA foi checada comparando amostras de cDNA com RNA que não sofreram transcrição reversa. Observando as curvas de amplificação em qPCR o controle negativo não deve ser detectado ou se detectado apresentar-se com uma diferença de no mínimo 5 ciclos de amplificação (NOLAN et al., 2006). Em seguida foi realizada a síntese de cDNA seguindo o protocolo do Kit Superscript (Invitrogen).

Bazire e colaboradores (2005) identificaram **primers** que são capazes de amplificar genes responsáveis pela produção de raminolipídeo. Foram utilizados primers que amplificam as regiões gênicas *rhIA*, *rhIB* e *rhIC*. A tabela abaixo mostra a sequência dos primers, identificados para os genes responsáveis pela produção de raminolipídeo, que foram utilizados na reação de RT-PCR.

**Tabela 01.** Sequência dos primers relacionados com a produção de raminolipídeos

Gene Alvo	Sequência do Primer F (5'-3')	Sequência do Primer R (5'-3')	Tamanho do fragmento
<i>RhII</i>	5'-CATCAGGTCTTCATCGAGAAGCT-3'	5'-CGACGATGTAGCGGGTTTG-3'	106 pb
<i>RhIAB</i>	5'-GATCGAGCTGGACGACAAGTC-3'	5'-GCTGATGGTTGCTGGCTTTC-3'	95 pb
<i>RhIC</i>	5'-ACCGGATAGACATGGGCGT-3'	5'-GATCGCTGTGCGGTGAGTT-3'	132 pb

Fonte: Bazire *et al*, 2005.

Os primers foram testados por PCR convencional para verificar a amplificação dos oligonucleotídeos antes de serem iniciados os testes em PCR quantitativo em tempo real. Como referência endógena foram utilizado os genes *acpP* e *proC* para *Pseudomonas* previamente identificado por Lenz e colaboradores (2008) e por Savli e colaboradores (2003).

Foi realizado um experimento controle dos primers para a reação de PCR quantitativo em tempo real para examinar a linearidade de amplificação durante uma variação dinâmica a fim de determinar a eficiência de amplificação dos mesmos. A eficiência dos primers foi considerada satisfatória (85% a 115%), sendo assim avaliada a estabilidade (HELLEMANS et al., 2007). Os genes de controle endógeno devem apresentar uma alta estabilidade para serem

utilizados como normalizador de cada amostra. Utilizou-se o Genorm que é um programa que determina se o gene referência apresenta-se estável e calcula com base na média geométrica do gene testado um fator de normalização que pode ser incorporado na expressão do gene em cada amostra. A estabilidade do gene é representada por um valor M, o qual é inversamente proporcional à variação de expressão do gene avaliado. Gene com alta estabilidade entre as repetições biológicas e tratamentos devem apresentar valor do geNorm  $M \leq 0,5$  (VANDESOMPELE et al., 2002; HELLEMANS et al., 2007; PINHEIRO, 2009).

A expressão dos três genes relacionados com a produção foi analisada em triplicata (n=3) para cada repetição biológica (n=2). O Perfil de amplificação foi apresentado como uma relação para cada fragmento dos genes a 48h e 120h, após a inoculação em comparação com a expressão dos fragmentos dos genes calibrador (0h). O programa de corrida para amplificação consistiu de um primeiro passo 50°C por 2 min. Depois 40 ciclos alternando entre 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. Por último foi traçada a curva de melting para detectar dímeros de primers, contaminante de DNA e produto de PCR inespecífico, gerando desta forma a confirmação da amplificação correta dos fragmentos de interesse. Temperaturas de dissociação do amplicon variando de 78°C a 85°C indicam amplificação de produto específico (alvo), abaixo dessa temperatura significa contaminação ou formação de dímeros de “primers” na reação.

Os dados de expressão gênica foram calculados por quantificação relativa, a qual necessita além do gene referência, uma amostra como referência, ou seja, como tratamento controle ou calibrador para a determinação da expressão (PFAFFL, 2001). Utilizou-se como controle interno da expressão o valor de Ct (cycle threshold) obtido no tempo 0h do experimento que foi definido como amostra calibradora, pois são amostras que vieram do pré-inoculo (meio LB) ou seja, que não foram submetidas aos meios de produção com glicerina bruta e glicerina comercial a 2%. A expressão relativa das amostras em MSM 2% GB e MSM2% GC foram então comparadas nos intervalos de tempo 48h e 120h.

Para cada tratamento foi detectado o valor de Ct, tanto para o gene alvo quanto para o gene referência. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. A quantificação relativa foi feita seguindo o modelo matemático proposto por Pffafll (2001), neste modelo temos a razão da expressão relativa (R), que é dada pela equação:

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{Ct alvo (controle - amostra)}}}{(E_{\text{ref.}})^{\Delta\text{Ct ref. (controle - amostra)}}$$



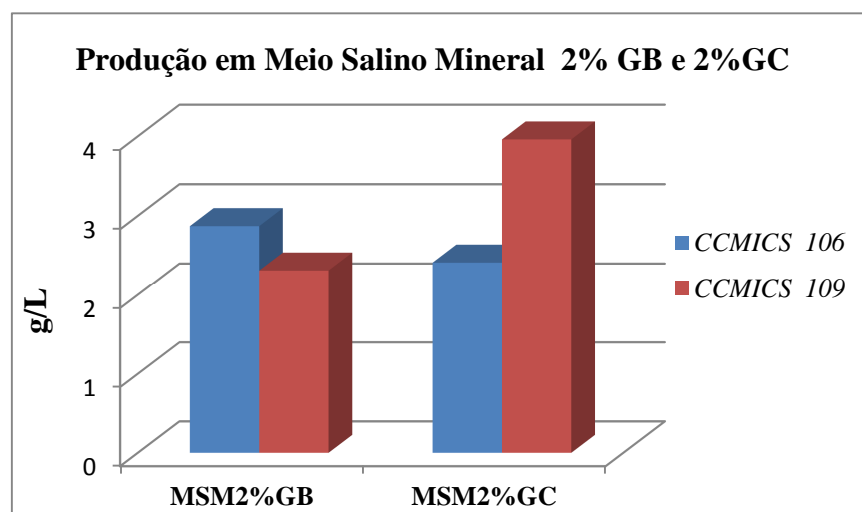
onde ,  $\Delta Ct$  mostra a variação de expressão de um gene do grupo amostral, em relação ao grupo controle. Com os valores de  $\Delta Ct$ , calculados tanto para o gene alvo como para o gene de referência (ref.), e das eficiências de amplificação dos genes (E), obtém-se a expressão relativa (R'), dada pela equação:  $R' = E^{-\Delta Ct}$ , que mede o efeito do tratamento experimental sobre a expressão de cada um dos genes. A razão entre os valores de R', do gene alvo e do gene referência, normaliza a expressão do gene em estudo. Quando são utilizados dois ou mais genes referência, os valores referentes a estes, serão aplicados como média geométrica.

Os resultados do PCR em tempo real são dados não-lineares e normalmente apresentam heterogeneidade de variância entre as repetições biológicas dentro de tratamentos e entre tratamentos, sendo necessário transformar os valores de Ct da análise da expressão relativa para logaritmo na base de dois (RIEU & POWERS, 2009) para que possa ser realizada a análise estatística. A análise estatística foi realizada pelo programa Assistat, utilizando análise de variância (A Nova) pelo teste de Dunnett.

### 4.2.3. Resultados

#### 4.2.3.1. Quantificação do raminolipídeo

Com base na quantificação de raminolipídeo pela técnica do orcinol : ácido sulfúrico observou-se que no MSM2%GB a linhagem *CCMICS 106* produziu 2,8g/L de biossurfactante e a linhagem *CCMICS 109* produziu 2,3g/L, mostrando assim que não houve diferença significativa na produção entre as linhagens neste meio.

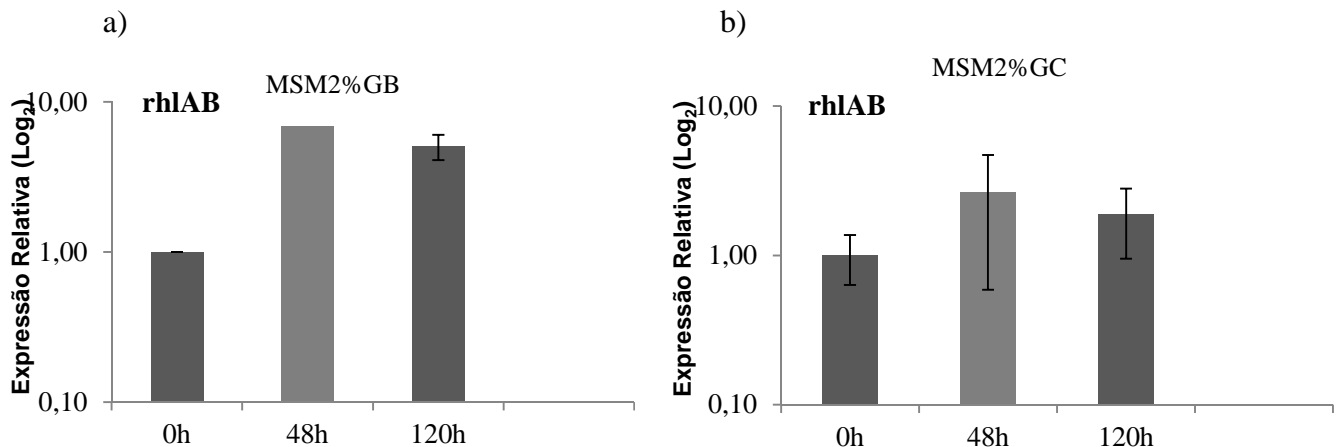


**Gráfico 01:** Dosagem de raminolipídeo pelo método orcinol : ácido sulfúrico, com 120 horas de produção.

Analisando a produção no MSM2%GC observou-se com base na quantificação que houve diferença significativa de produção entre as linhagens ( $p < 0,05$ ), pois a linhagem *CCMICS 106* produziu 2,4g/L e a linhagem *CCMICS 109* produziu 3,9g/L. Observou-se que mesmo não tendo diferença significativa de produção no MSM2%GB, a linhagem *CCMICS 106* produziu um pouco mais e no MSM2%GC a maior produção foi observada pela linhagem *CCMICS 109*.

#### 4.2.3.2. Análise da expressão Gênica – *CCMICS 106*

Na linhagem *CCMICS 106* com 48 horas de produção, a expressão do gene autoindutor *rhlI* foi 0,8x a mais no MSM2%GB do que no MSM2%GC. No entanto com 120 horas de produção observou-se o contrário, ou seja, a linhagem passou a apresentar uma maior expressão do gene *rhlI* no MSM2%GC, sendo esta expressão 0,6x maior do que o MSM2%GB. Analisando a expressão do gene *rhlAB* responsável pela produção do mono-raminolípeido, observou-se que com 48 horas de produção houve uma expressão de 6,8x a mais no MSM2%GB do que no MSM2%GC, com 120 horas de produção a expressão no MSM2%GB também foi maior, ou seja, 3,2x a mais do que o MSM2%GC conforme mostra o gráfico 02.

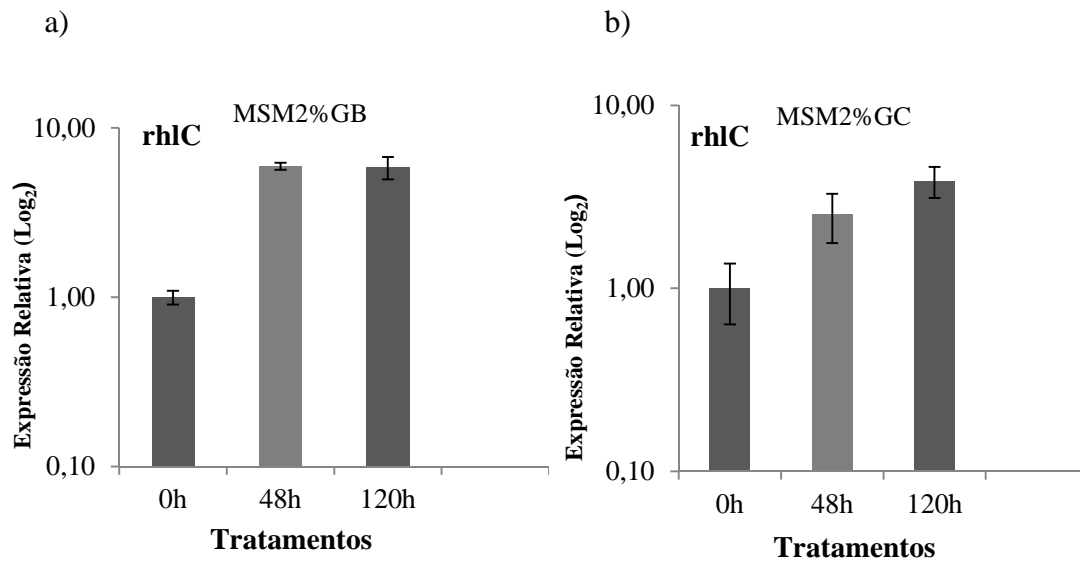


**Gráfico 02.** Análise da expressão do gene *rhlAB* na linhagem *CCMICS 106*.

Comparando a expressão gênica entre os intervalos de tempo observou-se que a expressão do *rhlAB* foi maior com 48 horas em ambos os meios de produção.

O gene *rhlC* responsável pela produção do di-raminolípeido apresentou a mesma expressão com 48 e 120 horas de produção no MSM2%GB. Quando comparada a expressão com o MSM2%GC, observou-se que com 48 horas de produção a expressão no MSM2%GB

foi 3,4x a mais do que o MSM2%GC e com 120 horas de produção a expressão foi 2x a mais (Gráfico 03).



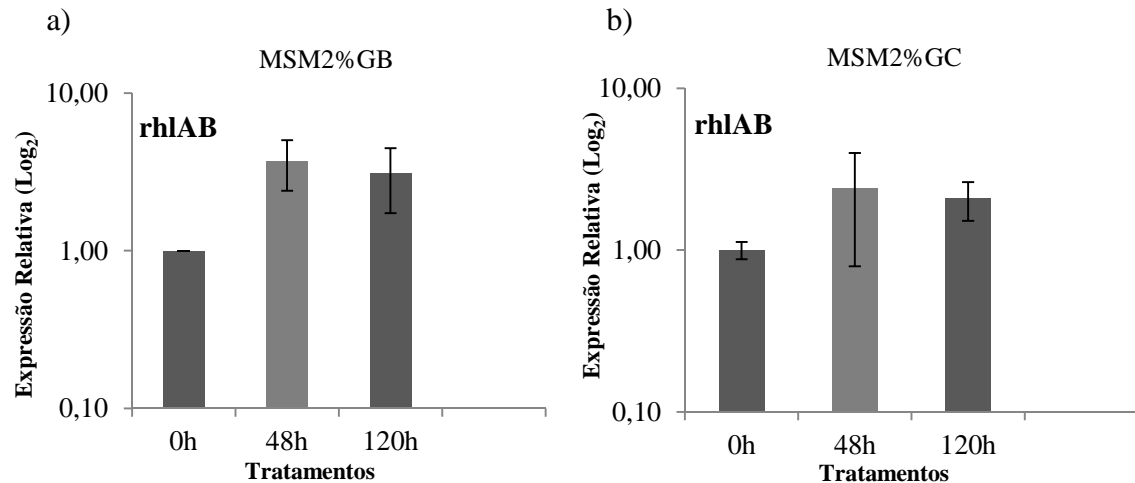
**Gráfico 03.** Análise da expressão do gene *rhIC* na linhagem *CCMICS 106*.

A expressão do gene *rhIC* entre os intervalos de tempo (48h e 120) foi a mesma no MSM2%GB, porém no MSM2%GC houve aumento da expressão com 120 horas de produção.

Com base na análise estatística pelo teste de Dunnett só foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no MSM2%GB, com os genes *rhLAB* e *rhIC*. No MSM2%GC não houve diferença significativa em relação ao calibrador (0h). Segundo Pinheiro (2009), devido à sensibilidade da técnica RT-qPCR usada para o estudo da expressão, o intervalo de confiança pode mostrar-se grande, o que muitas vezes torna difícil visualizar a significância nos resultados.

#### 4.2.3.3. Análise da expressão Gênica – *CCMICS 109*

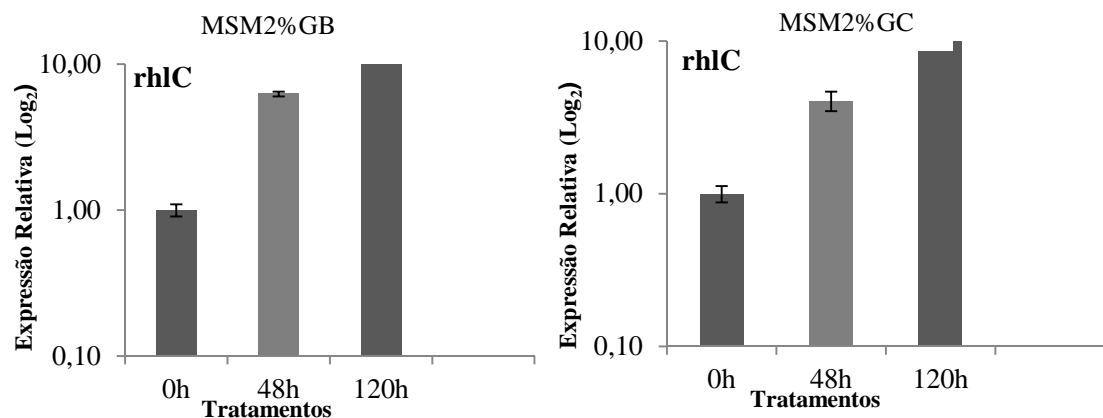
Na linhagem *CCMICS 109* o gene autoindutor *rhII* apresentou um padrão de expressão similar entre os meios de produção, pois com 48 horas de produção observou-se que a expressão no MSM2%GB foi apenas 0,3x a mais do que no MSM2%GC e com 120 horas de produção a expressão foi apenas 0,1x a mais no MSM2%GB. Em relação à expressão do gene *rhLAB* com 48 horas de produção a expressão no MSM2%GB foi 1,3x a mais do que no MSM2%GC e com 120 horas de produção a expressão no MSM2%GB foi 1x a mais.



**Gráfico 04:** Análise da expressão do gene *rhlAB* na linhagem *CCMICS 109*.

Com base na análise do gráfico 03 (a e b) foi possível observar que a expressão do gene *rhlAB* entre os intervalos de tempo (48h e 120h) foram semelhantes tanto no MSM2%GB como no MSM2%GC.

Analisando a expressão do gene *rhlC* observou-se que com 48 horas de produção a expressão no MSM2%GB foi 2,1x maior do que no MSM2%GC. Com 120 horas de produção notou-se que a expressão foi 6x maior no MSM2%GB em relação ao MSM2%GC.



**Gráfico 05:** Análise da expressão do gene *rhlC* na linhagem *CCMICS 109*.

Comparando os intervalos de tempo nos meios de produção, foi possível verificar que no MSM2%GB com 120 horas de produção a expressão duplicou em relação a 48 horas, e no MSM2%GC a expressão triplicou quando comparada com 48 horas de produção.

Com base na análise estatística pelo teste de Dunnett foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em ambos meios de produção, porém apenas para o gene *rhIC*.

#### 4.2.4. Discussões

O gene *rhII* funciona como auto indutor pois sintetiza N-butilil-homoserina lactona que ativa o *rhIR*, sendo este responsável pela ativação do operon *rhIAB* responsável pela síntese de raminolipídeo (OCHSNER et al., 1994; PEARSON et al., 1994). Observou-se nos resultados da expressão gênica da linhagem *CCMICS 106* que com 48 horas de produção o gene *rhII* apresentou uma expressão de 0,8x a mais no MSM2%GB do que no MSM2%GC, porém mesmo apresentando uma maior expressão do auto indutor no MSM2%GB neste intervalo de tempo não foi visualizada produção de biossurfactante com base nos resultados do índice de emulsificação - E24 (dados não mostrados). Entretanto no MSM2%GC que apresentou uma expressão mais baixa, observou-se formação de emulsão neste intervalo de tempo sugerindo assim duas hipóteses: 1<sup>a</sup> o gene auto indutor começou a expressar mais cedo no MSM2%GC já que a produção também começou mais cedo; 2<sup>a</sup> a mínima expressão do gene *rhII* neste meio de produção foi suficiente para ativar o gene *rhIR* responsável pela ativação do operon *rhIAB*, o que não ocorreu no MSM2%GB. Porém com 120 horas de produção a expressão passa a ser invertida, ou seja, a linhagem passa a apresentar uma maior expressão no MSM2%GC, sendo esta expressão 0,6x a mais do que o MSM2%GB. Com base nestes resultados subentende-se que o gene autoindutor após ativar os genes produtores de raminolipídeo diminui sua expressão, já que no MSM2%GB com 48 horas não houve produção, e com 120 horas foi onde observou maior produção (63%), e foi o momento em que a expressão estava mais baixa.

Na linhagem *CCMICS 109* observou-se que o gene autoindutor *rhII* apresentou um padrão de expressão similar entre os meios de produção tanto com 48 horas como 120 horas, mostrando assim que a linhagem apresenta o mesmo comportamento para o gene autoindutor em meios de produção diferente. Tais resultados corroboram com os resultados encontrados na produção, onde foi possível observar que nesta linhagem a produção de biossurfactante iniciou no mesmo intervalo de tempo para ambos os meios (dados não mostrados), justificando assim a similaridade da expressão.

Analisando os resultados da expressão do gene *rhIAB* responsável pela produção do mono-raminolipídeo, observou-se que na linhagem *CCMICS106* com 48 horas de produção houve uma expressão de 6,8x a mais no MSM2%GB do que no MSM2%GC, porém como

mencionado anteriormente neste intervalo de tempo não foi observado produção de biossurfactante no MSM2%GB. Com base nestes resultados podemos inferir que a mínima expressão do gene *rhlAB* no MSM2%GC foi suficiente para ter um bom rendimento na produção, porém no MSM2%GB observou-se que é necessário uma maior expressão deste gene para o biossurfactante poder ser traduzido, pois mesmo tendo uma expressão de 6,8x a mais a produção só foi visualizada após 48 horas (dados não mostrados). O mesmo foi observado com 120 horas, pois a mínima expressão deste gene no MSM2%GC foi suficiente para produzir 2,4g/L de biossurfactante, enquanto a expressão de 3,2x a mais no MSM2%GB produziu uma quantidade similar, ou seja, 2,8g/L de biossurfactante. Na linhagem *CCMICS 109* a expressão foi maior no MSM2%GB em ambos os intervalos de tempo, porém comparando os resultados da expressão com os resultados da produção observou-se que a produção foi maior no MSM2%GC já que a mesma produziu 3,9g/L neste meio e no MSM2%GB a linhagem produziu 2,3g/L. Diante dos resultados podemos inferir que a mínima expressão deste gene no MSM2%GC foi suficiente para produzir uma maior quantidade de biossurfactante, assim como foi observado na linhagem *CCMICS 106*.

Comparando a expressão entre as duas linhagens observa-se que as mesmas tiveram um comportamento de expressão esperado entre os meios de produção, pois a linhagem *CCMICS 106* apresentou maior expressão do gene *rhlAB* com 120 horas no MSM2%GB assim como observou-se uma maior produção neste intervalo de tempo. Na linhagem *CCMICS 109* a maior produção ocorreu no MSM2%GC assim como apresentou uma maior expressão do *rhlAB* que com 120 horas de produção também foi um pouco maior do que no MSM2%GB.

O gene *rhlC* é responsável por codificar a raminosil transferase 2 (Rt2) a partir da desoxi-timidina-difosfo-L-raminose agindo como doador e mono-raminolípeido agindo como receptor, produzindo assim o di-raminolípeido (LEÃO, 2009). Com base nos resultados foi possível observar a expressão deste gene nas duas linhagens e nos dois meios de produção testados. Observou-se que em ambas as linhagens a expressão deste gene foi maior no MSM2%GB nos dois intervalos de tempo, em relação ao MSM2%GC. Porém na linhagem *CCMICS 109* o gene *rhlC* foi o que apresentou uma maior expressão em relação aos outros genes (*rhlI* ; *rhlAB*) em ambos os meios de produção. Tal fato foi observado também por Bazire e colaboradores (2005) onde utilizaram os mesmos primers e analisaram a expressão sob estresse osmótico em *P. aeruginosa*, e observaram que o gene *rhlC* foi o que apresentou também um maior nível de expressão. Porém o fato de ser observado uma maior expressão deste gene não significa que terá maior produção de di-raminolípeido, pois como foi

observado anteriormente uma baixa expressão gênica no MSM2%GC foi suficiente para promover a tradução e produzir praticamente a mesma quantidade de biosurfactante. Outro fator interessante é que a produção do di-raminolípeido depende do mono-raminolípeido para ser sintetizado, pois que segundo Rahim e colaboradores (2001) alguns dos mono-raminolípeido produzido é secretado diretamente da célula, enquanto uma parte dele permanece na face citoplasmática da membrana interna para ser transformado pelo *rhIC* em di-raminolípeido. Logo mesmo tendo uma alta expressão e produção da *Rt2* a síntese do di-raminolípeido vai depender da quantidade de mono-raminolípeido disponível na célula.

#### 4.2.5. Conclusões

- O gene *rhLAB* foi o que apresentou uma maior expressão na linhagem *CCMICS 106*, sendo esta expressão visualizada no MSM2%GB em ambos intervalos de tempo, assim como a maior produção neste meio também foi visualizada por esta linhagem.
- O gene *rhIC* foi o que apresentou uma maior expressão na linhagem *CCMICS 109*, em ambos os meios de produção, sugerindo assim que esta linhagem pode ser uma boa produtora de di-raminolípeido, pois como base nos resultados da expressão do gene *rhLAB* houve produção de mono-raminolípeido, e com isso podemos inferir que caso o mono-raminolípeido não tenha sido secretado diretamente da célula e esteja disponível, o mesmo pode atuar como receptores, produzindo assim o di-raminolípeido.
- Para avaliar a produção de di-raminolípeido é necessário avaliar a expressão do gene *rhIC* junto com o *rhLAB*, pois nem sempre uma alta expressão do *rhIC* significa uma alta produção de di-raminolípeido já que a mesma depende da disponibilidade de mono-raminolípeido.
- A depender da fonte de carbono utilizada e do tipo de linhagem bacteriana, a mínima expressão de um gene pode ser bastante significativa para determinar uma boa produção, pois observou-se que uma baixa expressão gênica no MSM2%GC foi suficiente para traduzir a proteína e produzir praticamente a mesma quantidade de biosurfactante produzido no MSM2%GB .

#### 4.2.6. Referências

ABOUSEOUD, M. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination** 223 (2008) 143–151

BANAT, P.I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur** 198, Mars 2000.

BAZIRE, A. et al. Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters** 253 (2005) 125-131.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods** Vol. 32, Issue 3, 1 May 1998, Pages 273–280.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.

COLLA, L.M.; COSTA, J. A.V. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Revista Veter**, Rio Grande, 13: 85-103, 2003.

DESAI, J.D.; BANAT, I. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Rev.** 1997, Vol. 61(1), p. 47-64.

HABA, E. et al . A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology** 2000, 88, 379–387.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res.** 1996 6: 986-994.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v. 8, n. 2, p. R19, jan 2007.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & Appl. Chern.**, Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737, 1992.

LEÃO, B.A. **Agentes Inibidores da Atividade Metabólica e do Processo de Adesão de *Desulfotomaculum nigrificans* em Euperfície de Aços Inoxidável.** (Dissertação) UFV-Viçosa, 2009. Disponível em: [http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde\\_arquivos/36/TDE-2010-03-17T061631Z-2164/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/36/TDE-2010-03-17T061631Z-2164/Publico/texto%20completo.pdf)

LENZ, A.P. et al. Localized Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, july 2008, p. 4463–4471

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

MONTEIRO, S.A. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*** UFPEDA 614. (Tese). UFPR, 2007. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/11333/SAFI%20AMARO%20MONT EIRO.pdf;jsessionid=02600E587273588D38A30761AEE971FA?sequence=1>

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RTPCR. **Nat. Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559-1582, nov 2006.



OCHSNER U.A.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation and Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB gene Encoding a Rhamnosyltransferase involved in Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, August 1994, p. 19787- 19795 , Vol. 269, No.31

PEARSON, J. P. et al. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA - **Biochemistry** 91:197–201, 1994.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.

PINHEIRO, T.T. **Análise da expressão de genes associados à via de biossíntese de ácidos graxos em *Theobroma cacao* e ao acúmulo de ácido esteárico.** (Dissertação) Programa de Pós Graduação em ciências, USP 2009. Disponível em: [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde.../Mestrado.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde.../Mestrado.pdf)

RAHIM, R. et al. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, and enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, 2001, 40(3), 708-718

RIEU, I.; POWERS, S.J. Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. **The Plant Cell**, Vol. 21: 1031–1033, April 2009

SAVLI, H. et al. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. **Journal of Medical Microbiology** 2003, 52, 403–408

SILVEIRA, M.C. **Procedimentos em técnicas laboratoriais vegetais.** UFT, Gurupi, 2010. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/42927934/106/Isolamento-de-rna-pelo-metodo-trizol>

SOUSA, J.R. **Produção de Biossurfactantes a Partir da Glicerina Obtida da Produção de Biodiesel.** UFC, 2008. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp070273.pdf>

STRELEC, T. **Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídios polihidroxicanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese.** São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp022382.pdf>

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 356-360, 2002.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. DE; PATTYN, F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 34.1-34.11, 18 jun 2002.

WANG, Q. et al. Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 98, No. 4, November 1, 2007

## 5. REFERÊNCIAS

ABOUSEOUD, M. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination** 223 (2008) 143–151

ALMEIDA A. P. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.34, n.3, p.133-148, jul./set. 2010.

ALMEIDA, K.C. **RT-PCR Quantitativo em Tempo Real para Análise do Receptor de Egf em Complexos Cumulus-Oócito Colhidos por Laparoscopia em Cabras Caniné Submetidas à Estimulação Hormonal Ovariana.** (Dissertação) Universidade Estadual do Ceará, 2009. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp119098.pdf>

ANANDARAJ, B.; THIVAKARAN, P. Isolation and Production of Biosurfactant Producing Organism From Oil Spilled Soil. **J. Biosci Tech**, Vol 1 (3),2010,120-126

BANAT, P.I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur** 198, Mars 2000.

ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 162-168, 1996.

BARBOSA, A.P.A.S; GONDIM, A.L.N.; PAZ, M.C.F. Remoção do Corante Preto Pirazol por *pseudomonas aeruginosa*. **II CONEPI** - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007

BARBOSA, S.A. **Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biosurfactantes como matéria-prima.** (Tese) Renorbio - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, São Cristóvão- SE 2011. Disponível em: [http://bdtd.ufs.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=64](http://bdtd.ufs.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=64)

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23-39, 2002.

CAMEOTRA, S.S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories** 2009, 8:16

CAMILLI, A.; BASSLER, B.L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. **Science**. 2006 February 24; 311(5764): 1113–1116

CAMPOS-GARCIA, J. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG Gene Encodes an NADPH Dependent b-Ketoacyl Reductase Which Is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. **Journal of Bacteriology**, sept. 1998, p. 4442–4451 vol. 180, no. 17

CHÁVEZ, J. D. R. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.** (Dissertação) São Paulo, 2008. Disponível em: [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde.../BID08009.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde.../BID08009.pdf)

COLLA, L.M.; COSTA, J. A.V. Obtenção e Aplicação de Biosurfactantes. **Revista Vetor**, Rio Grande, 13: 85-103, 2003.

COSTA, S.G.V.A.O. **Estudo da Produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: rhamnolípideos e Polihidroxicanoatos (PHAs).** (Tese) Rio Claro/SP 2010. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br>

CUBAS, J.L. et al. Neutralização da glicerina bruta obtida pela transesterificação dos óleos de crambe, cártamo e soja. **4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Minas Gerais, 2010.

DELATORRE, A. B. et al. Produção de Biodiesel: Considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. **Perspectiva online**. Ciência Biológicas e da Saúde, 2011, Vol. 1, nº 1. [seer.perspectivasonline.com.br](http://seer.perspectivasonline.com.br).

DESAI, J.D.; BANAT, I. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Rev.** 1997, Vol. 61(1), p. 47-64.

DEZIEL, E. et al. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology** (2003), 149, 2005–2013

DILLIS, S. S. et al. Carbohydrate Transport in Bacteria. **Microbiological reviews**, Sept. 1980, p. 385-418. Vol. 44, No. 3

DONG, Y. ; et al. A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa*. **Communicative & Integrative Biology** 1:1, 88-96; July/August/September, 2008

FUENTEFRÍA, D.B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(5):470-473, set-out, 2008.

GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **European Journal of Biochemistry**, v.6, n.2, p. 165-172, 1968.

GUERRA-SANTOS, L. H.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 301-305, 1984

GOMES, M. J. P. Gênero *Pseudomonas* spp. **Microbiologia Clínica. LABACVET 2008-2 Bacteriologia.**

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology** 2000, 88, 379–387

- HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res.** 1996 6: 986-994.
- HEYD, M. K. A. et al. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Anal Bioanal Chem.** 2008; 391: 1579-1590.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F. A.O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, UFSM, 29 (1): 7 - 24, 2007.
- KOCH, A. K. et al. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 4212-4219, 1991.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & Appl. Chem.**, Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737, 1992.
- LADEIRA, BRUNO L.; MALLMANN, CHRISTIAN; BURKERT, CARLOS ANDRÉ V. Uso de Glicerina Residual no Cultivo de Diferentes Leveduras. **XII ENPOS**, 2011.
- LEÃO, B.A. **Agentes Inibidores da Atividade Metabólica e do Processo de Adesão de *Desulfotomaculum nigrificans* em Superfície de Aços Inoxidável.** (Dissertação) UFV-Viçosa, 2009. Disponível em: [http://www.tede.ufv.br/teedesimplificado/tde\\_arquivos/36/TDE-2010-03-17T061631Z-2164/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/teedesimplificado/tde_arquivos/36/TDE-2010-03-17T061631Z-2164/Publico/texto%20completo.pdf)
- LUBISCO, N.M.L.; VIEIRA, S.C.; SANTANA, I.V. **Manual de estilo acadêmico: monografias, dissertações e teses.** 4. ed. rev. e ampl. Salvador: EDUFBA, 2008. 145 p. ; il.
- MAIA, A. A. et al. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(1): 114-119, jan.-mar. 2009
- MAIER, R. M.; CHAVÉS, G. S. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p.625-633, 2000.
- MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 27:675-83. (2005)
- MATA, P.T.G.; ABEGG, M.A. Descrição de Caso de Resistência a Antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arq Mudi.** 2007;11(2):20-25.
- MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G.. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* Operon Is Not Expressed during the Logarithmic Phase of Growth Even in the Presence of Its Activator RhIR and the Autoinducer *N*-Butyryl-Homoserine Lactone. **Journal of Bacteriology**, jan. 2003, p. 377-380
- MILLIOLI, V.S.; SANTOS, L.C. Avaliação da potencialidade do uso de biosurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. **XI Seminário de Iniciação Científica**, Ouro Preto, 2003.
- MONTEIRO, S.A. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.** (Tese). UFPR, 2007. Disponível em:

<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/11333/SAFI%20AMARO%20MONT EIRO.pdf;jsessionid=02600E587273588D38A30761AEE971FA?sequence=1>

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** – Edição nº 33- jul/dez 2004.

OCHSNER, U.A. et al. Isolation and Characterization of a Regulatory Gene Affecting Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Apr. 1994, p. 2044-2054 , Vol. 176, No. 7

OCHSNER U.A.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation and Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB gene Encoding a Rhamnosyltransferase involved in Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, August 1994, p. 19787- 19795 , Vol. 269, No.31

OCHSNER, U.A.; REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemistry**, Vol. 92, pp. 6424-6428, July 1995.

OKOLIEGBE I.N.; AGARRY O.O. Of Microbial Surfactant (a review). **Scholarly Journals of Biotechnology** Vol. 1(1), pp. 15-23, April 2012

PEARSON, J. P.; et al. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA - **Biochemistry** 91:197–201, 1994.

PEIXOTO, R.M. **Bioprospecção de micro-organismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes**. USP, 2008. (Dissertação) Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132tde-31032009-092533/pt-br.php>

PESCI, E.C. et al. Regulation of las and rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, May 1997, p. 3127–3132 Vol. 179, No. 10

PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A. VIEIRA. Avaliação Cinética da Produção de Biossurfactantes Bacterianos. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 8, 2104-2108, 2009

PIROLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. UNESP, Rio Claro 2006.(Dissertação) Disponível em: [http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Maria-Paula-Santos-Pirollo\\_PRH05\\_UNESP\\_M.pdf](http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Maria-Paula-Santos-Pirollo_PRH05_UNESP_M.pdf)

PORNSUNTHORNTAWEE, O. et al. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal** 42 (2008) 172–179.

RAHIM, R. et al. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhIC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, and enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, 2001, 40(3), 708-718

RAMKRISHNA, SEM. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science** 34 (2008) 714– 724

RAZA, Z.A. et al. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, p. 115–121, 2007.

REIS, RODRIGO S. et al. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. **Bioresource Technology** 102 (2011) 6377-6384.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactantes. **Environmental Microbiology**. v. 3, p. 229-236, 2001.

SAEKI, H. et al. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. **Bioresource Technology** 100 (2009) 572–577

SANTANA FILHO, A.P. **Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* ufpeda 614: estudos de produção e de variação da composição de homólogos.** (Dissertação) UFP, 2009. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/23088/dissertação%20arquimedes%20p%20santana%20filho.pdf?sequence=1>

SCHENA M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, p.467-470, 1995.

SILVA, A.M.F.D. **Biodegradação de petróleo e produção de biosurfactante por bactérias nativas do sedimento do manguezal de gargáú.** (Monografia), UENF, 2011 RJ. Disponível em: [http://www.inct-tmcocean.com.br/pdfs/Monografias/Mon\\_graduacao/17\\_uenfalineMongografia.pdf](http://www.inct-tmcocean.com.br/pdfs/Monografias/Mon_graduacao/17_uenfalineMongografia.pdf)

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

SIQUEIRA, F.S. Mecanismos de resistência a  $\beta$ - Lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista do Biomédico**, Julho/Agosto 2002, pag 24.

STRELEC, T. **Isolamento de bactérias produtoras de biosurfactantes ramnolipídios polihidroxicanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese.** São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp022382.pdf>

STOLF, RENATA. **Identificação e análise da expressão de genes relacionados com tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real.** (Tese) São Paulo, 2007. Disponível em: [www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/d/2986.pdf](http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/d/2986.pdf)

THANOMSUB, B. et al. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology** 97 (2006) 2457–2461.

TONINI, R.M.C.W.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por Bactérias: revisão. **Oecologia Australis** 14(4): 1025-1035, Dezembro, 2010.

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 356-360, 2002.

VALASEK, MARK A; REPA, JOYCE J. The power of real-time PCR. **Advan in Physiol Edu** 29:151-159,2005 .

VIEIRA, R. B. ; LIMA, J. B.; FRANÇA, F. P. ; SÉRVULO, E. F. C. ; CARDOSO, V. L. Estudo da produção de biosurfactante empregando culturas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e PALR. **VI COBEQ**, 2005.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, dez. 2000. 32p. Disponível em: [www.cnpab.embrapa.br/system/files/downloads/doc127.pdf](http://www.cnpab.embrapa.br/system/files/downloads/doc127.pdf)

ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A.; LAZARIDIS, N.K.; GOLYSHN, P.N. The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions. **Minerals Engineering** 16 (2003) 1231–1236. Science Direct, Elsevier

## APENDICES:

### Produção no Meio Salino Mineral - linhagem *CCMICS 106*



MSM 2%GC. Controle, A, B e C



MSM 2%GB. Controle, A, B e C

### Produção no Meio Salino Mineral - linhagem *CCMICS 109*

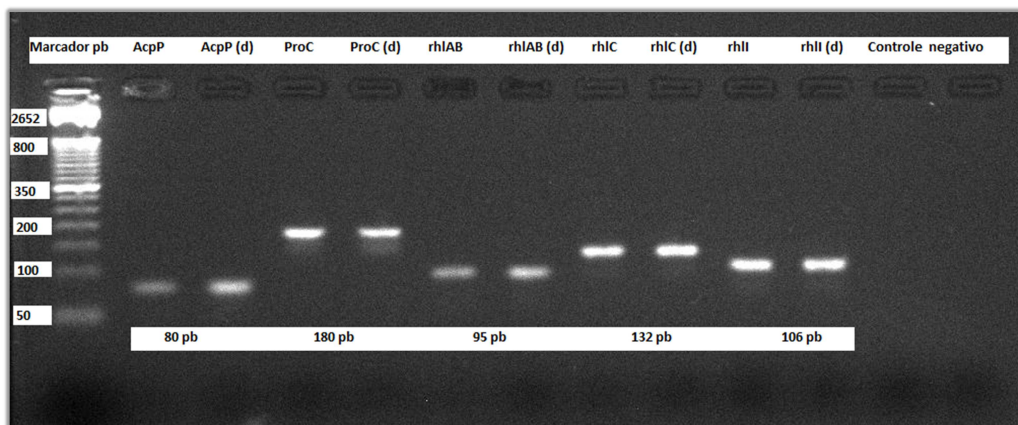


MSM 2%GC. Controle, A, B e C



MSM 2%GB. Controle, A, B e C

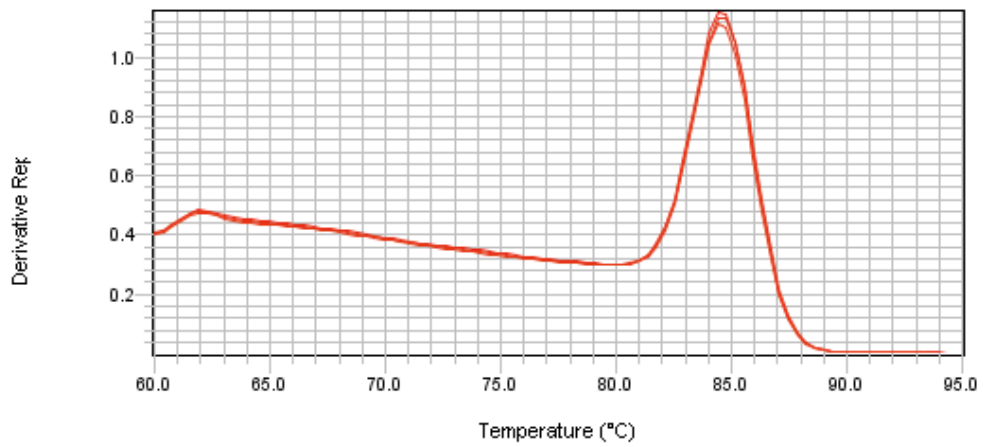
### Eletroforese dos produtos de PCR



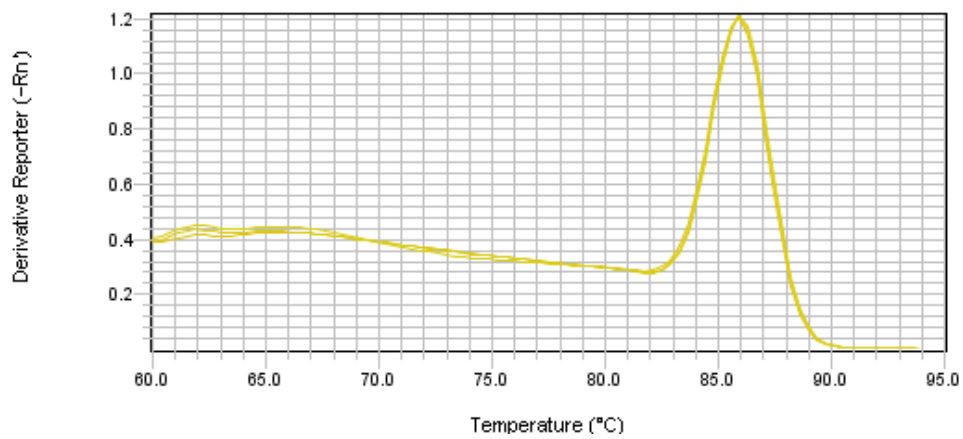
Eletroforese dos produtos de amplificação específica dos genes que foram quantificados, sendo identificados a partir dos seus fragmentos com tamanho esperado.



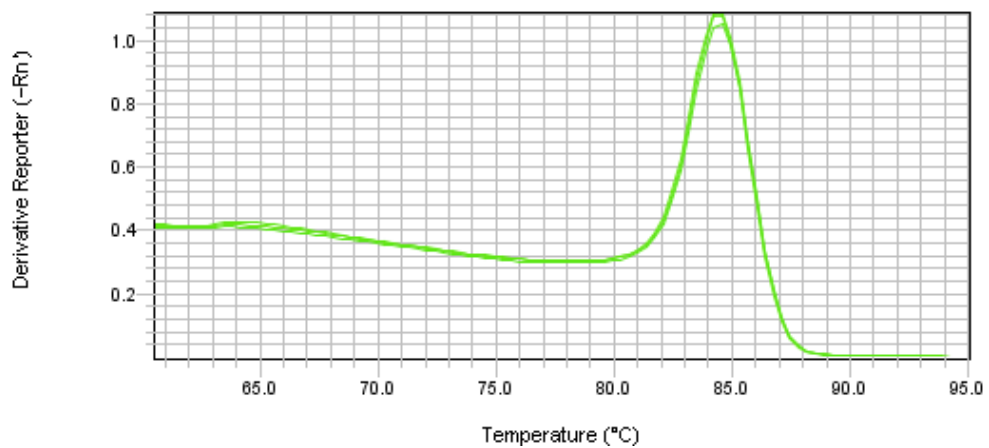
### Curva de Dissociação dos amplicons



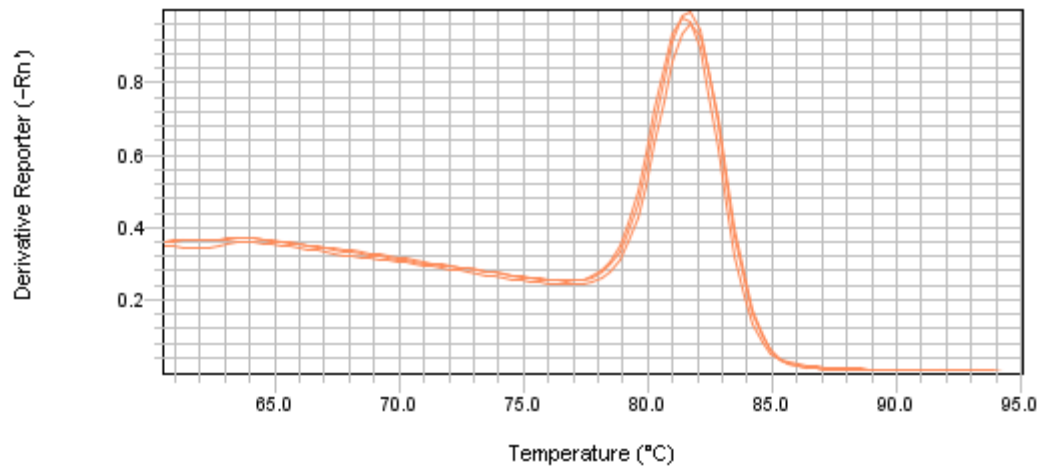
Curva de dissociação da amplificação do primer rhlAB.



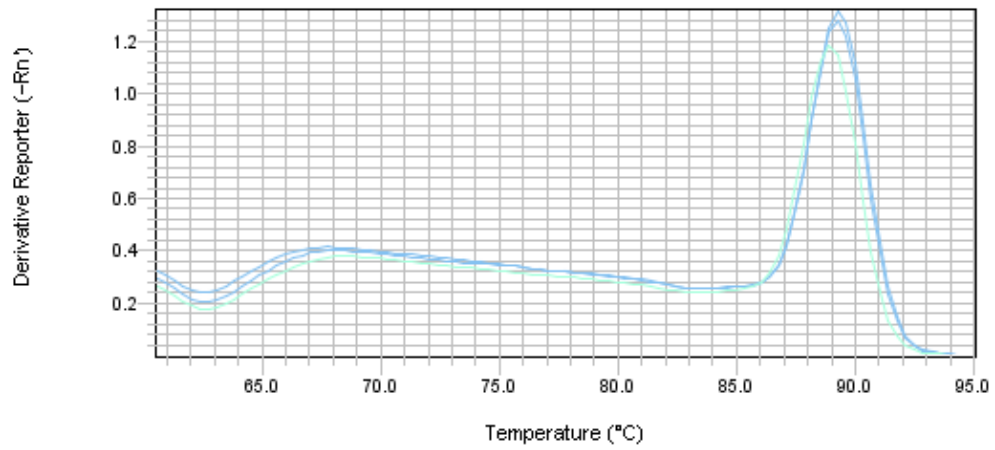
Curva de dissociação da amplificação do primer rhlC.



Curva de dissociação da amplificação do primer rhlI.



Curva de dissociação da amplificação do primer AcpP.



Curva de dissociação da amplificação do primer ProC