

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DOUMIT CAMILIOS NETO

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

CURITIBA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DOUMIT CAMILIOS NETO

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Co-orientadora: Prof^a. Dr. Nadia Krieger

CURITIBA

2010

Dedico este trabalho à minha mãe Georgette e às minhas irmãs Janete e Maria Tereza. Pelo amor e apoio incondicional de sempre. Jamais teria chegado aqui se não fosse por vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida;

Às minhas maiores incentivadoras minha mãe Georgette, minhas irmãs Janete e Maria Tereza e minha tia Therese;

Aos meus queridos sobrinhos Denise, Luís Antoun, Maria Júlia e Mariana;

Aos meus grandes amigos na família Alexandre, Graciano, Jean, Luiz, Marcelo, Odair e Wherdan;

Ao professor Dr. David Alexander Mitchell, por seu espírito científico, sua orientação, confiança e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger, por sua orientação, confiança e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Raina Margaret Maier, por sua orientação, confiança e apoio no desenvolvimento da etapa deste trabalho que foi desenvolvida em seu laboratório no Departamento de Soil, Water and Environmental Science da Universidade do Arizona;

À Julie Neilson, Diretora do laboratório da Dr^a. Maier, por sua orientação nos trabalhos desenvolvidos naquele laboratório;

À Aseneth Herrera, Pós-Doc do laboratório da Dr^a. Maier, por sua ajuda no desenvolvimento dos trabalhos desenvolvidos naquele laboratório;

Aos meus amigos do grupo de biossurfactantes do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise Arquimedes, Cryshelen, Joel e Safi. Tem um pouco do esforço de vocês em cada página deste trabalho;

Ao professor Dr. Guilherme L. Sasaki (Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR) por acompanhar o desenvolvimento deste trabalho desde o início pelas correções do projeto e dos relatórios;

A todos os meus queridos amigos que já fizeram parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise e aos que persistem: Alessandra, Aline, Alysson, Arnaldo, Arquimedes, Bárbara, Bianca, Cryshelen, Cristiane, Christiane, Dayane (Controle Positivo), Edgar, Edneia, Érika, Joel, Juliana, Juliane, Lídia, Malu, Marcelo, Kátia, Paola, Rodrigues, Safi, Talita, Thaís, Vivian e Viviane. Obrigada por vocês tornarem essa caminhada absolutamente mais agradável;

Aos meus *roommates* e grandes amigos Alex, Arquimedes e Gláucio;

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, por estimular, por meio de seus professores e funcionários, o desenvolvimento do espírito científico;

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, especialmente ao Professor Miguel, sempre absolutamente prestativo e gentil, à Professora Silvia por toda sua gentileza e orientação durante meu estágio na docência, e aos Professores Guilherme e Sheila que prontamente aceitaram contribuir com as correções deste trabalho;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico.

*“Infelizes os homens que têm todas
as ideias claras”*

Louis Pasteur

RESUMO

Nos últimos anos os biossurfactantes têm chamado a atenção pela baixa toxicidade, biodegradabilidade, e alta aceitabilidade ecológica. No entanto, a aplicação destes compostos ainda é muito limitada, devido aos altos custos de produção dos surfactantes de origem biológica em comparação aos de origem química. A fermentação em estado sólido apresenta-se como uma tecnologia alternativa para produção de biossurfactantes, com a importante vantagem de evitar a formação de espuma, um severo problema da produção de biossurfactantes por fermentação submersa. Neste trabalho otimizou-se a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, cultivada em meio sólido umedecido com solução de sais e glicerol. Durante este estudo, os níveis de produção foram aumentados em mais de 10 vezes, alcançando 172 g ramnolipídeos por quilograma de substrato seco inicial, em 12 dias de cultivo. Os níveis de produção, em base de solução umedecedora adicionada no sólido, foram na ordem de 46 g/L, os quais são comparáveis aos melhores resultados obtidos por fermentação submersa na literatura. As propriedades dos ramnolipídeos foram muito similares às obtidas por fermentação submersa, com concentração micelar crítica (CMC) de 46,8 mg/L e um índice de emulsificação (*E*) de mais de 90 % contra a gasolina, diesel e querosene depois de 24 h. As propriedades tensoativas mantiveram-se mesmo depois da autoclavação do sólido fermentado, o que indica que, através da esterilização por tratamento térmico do sólido antes dos procedimentos de extração, é possível se minimizar os riscos de infecção oportunista pelo *P. aeruginosa*. Estes resultados sugerem que a produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido apresenta um grande potencial. Com o intuito de se identificar genes relacionados com a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, microarranjos foram feitos para se comparar os perfis de transcrição da presença e ausência de caseinato de sódio no meio de cultivo. A presença de caseinato de sódio proporcionou um aumento na produção de ramnolipídeos de mais de dez vezes. Este aumento mostrou-se como um efeito de interação entre fatores nutricionais, expressão de genes *quorum-sensing* regulados e mudanças nos processos celulares básicos. Adicionalmente, o estudo da cinética de transcrição proporcionou informações sobre o perfil temporal da expressão dos genes relacionados com a biossíntese de ramnolipídeos.

ABSTRACT

In recent years biosurfactants have attracted attention because of their low toxicity, biodegradability, and ecological acceptability. However, their use is currently extremely limited due to their high cost in relation to that of chemical surfactants. Solid-state cultivation represents an alternative technology that has an important advantage to avoid the problem of foaming that complicates submerged cultivation processes for biosurfactant production. In the current work, the production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 was optimized, grown on a solid medium impregnated with a solution containing glycerol. During the study, the yield of biosurfactant production was increased over tenfold, with levels reaching 172 g rhamnolipid per kilogram of dry initial substrate after 12 days. On the basis of the volume of impregnating solution added to the solid support, this yield is of the order of 46 g/L, which is comparable with the best results that have been obtained to date in submerged liquid cultivation. The properties of the biosurfactant were very similar to those obtained in submerged culture, with a critical micelle concentration (CMC) of 46.8 mg/L and an emulsification index (*E*) of over 90% against gasoline, diesel and kerosene after 24 h. The surface properties were maintained after autoclaving of the fermented solids, meaning that it is possible to minimize the risks of opportunistic infections by *P. aeruginosa* by killing the producing organism with a heat treatment of the solids prior to product extraction. These results suggest that there is a great potential for using solid-state cultivation for the production of rhamnolipid. In order to identify genes related to rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a microarray was used to compare the transcript profiles in the presence and absence of sodium caseinate in the culture medium. With sodium caseinate there was a more than tenfold increase in rhamnolipid production. This effect appears to be due to an interaction between nutritional factors and quorum-sensing dependent gene expression. Additionally, a time course study gave insights into the timing of gene expression related with rhamnolipid biosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA VARIAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL, INTERFACIAL E DA SOLUBILIDADE DE COMPOSTO ORGÂNICO COM A CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO	21
FIGURA 02 -	RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
FIGURA 03 -	BIOSSÍNTESE DOS RAMNOLIPÍDEOS	34
FIGURA 04 -	SISTEMA QUORUM SENSING DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
FIGURA 05 -	PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	45
FIGURA 06 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE CRESCIMENTO OBTIDAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUPE 614 EM ERLENMEYERS E EM BIORREATOR	60
FIGURA 07 -	FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR	61
FIGURA 08 -	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	62
FIGURA 09 -	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS	71
FIGURA 10 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	74
FIGURA 11 -	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O CONSÓRCIO DE SUBSTRATOS BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO	79
FIGURA 12 -	SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	83
FIGURA 13 -	DETERMINAÇÃO DA CMC A PARTIR DE DILUIÇÕES SERIAIS DE SOLUÇÃO AQUOSA DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA POR FES	87
FIGURA 14 -	ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO [E, %, APÓS 24 H (BARRAS BRANCAS) E 1 MÊS (BARRAS CINZAS)], COM DIVERSOS HIDROCARBONETOS, A PARTIR DE SOLUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS (6,4 G/L) PRODUZIDOS COM <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614 POR FES	88
FIGURA 15 -	CURVAS DE CRESCIMENTO de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 A PARTIR DE MEIO SUPLEMENTADO COM CASEÍNA E SEUS DERIVADOS	95

FIGURA 16 -	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>P. aeruginosa</i> PAO1 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	97
FIGURA 17 -	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	99
FIGURA 18 -	DISTRIBUIÇÃO DOS GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RESPOSTA A PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO DE ACORDO COM A MAGNITUDE DA TRANSCRIÇÃO	99
FIGURA 19 -	CLASSES FUNCIONAIS DE GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RESPOSTA À PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO	103
FIGURA 20 -	CINÉTICA DO PERFIL TRANSCRICIONAL ABSOLUTO DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1 DURANTE CRESCIMENTO EM MEIO COM CASEINATO DE SÓDIO	125
FIGURA 21 -	CINÉTICA DO PERFIL TRANSCRICIONAL DOS GENES RELACIONADOS COM A BIOSÍNTESE SE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>P. aeruginosa</i> PAO1 DURANTE CRESCIMENTO EM MEIO COM CASEINATO DE SÓDIO ..	127

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	SURFACTANTES E RAMOS INDUSTRIAIS DE APLICAÇÃO	22
TABELA 2 -	PRINCIPAIS TIPOS DE BIOSURFACTANTES E SEUS MICRORGANISMOS PRODUTORES	24
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS PELO GÊNERO <i>Pseudomonas</i>	26
TABELA 4 -	PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	28
TABELA 5 -	SUBSTRATOS SÓLIDOS E CONSÓRCIOS DE SUBSTRATOS SÓLIDOS UTILIZADOS NAS FES	43
TABELA 6 -	VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO DELINEAMENTO FATORIAL (DCCR 2 ²)	46
TABELA 7 -	VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO DELINEAMENTO FATORIAL (DCCR 2 ³)	47
TABELA 8 -	EFEITO NAS CONCENTRAÇÕES DE RAMNOLIPÍDEOS OBTIDAS ATRAVÉS DE MODIFICAÇÕES NAS CONDIÇÕES PADRÃO DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614, EM 288 H DE FERMENTAÇÃO	64
TABELA 9 -	EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FARELO DE GIRASSOL AO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, ADIÇÃO DE MAIS GLICEROL E DO INÓCULO PRÉ-CULTIVADO NA SOLUÇÃO UMEDECEDORA NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS	69
TABELA 10 -	VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTS USADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL	72
TABELA 11 -	DELINEAMENTO FATORIAL COM AS CONCENTRAÇÕES DE RAMNOLIPÍDEOS OBSERVADAS E PREDITAS	73
TABELA 12 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA 11.....	73
TABELA 13 -	EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS SÓLIDOS NAS TAXAS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	77
TABELA 14 -	EFEITO DA ADIÇÃO DE MAIS GLICEROL À SOLUÇÃO UMEDECEDORA NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	78
TABELA 15 -	VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTS USADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL	80
TABELA 16 -	DELINEAMENTO FATORIAL COM AS CONCENTRAÇÕES DE RAMNOLIPÍDEOS OBSERVADAS E PREDITAS	82
TABELA 17 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA 16.....	82

TABELA 18 -	PROPRIEDADES TENSOATIVAS DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE MONO-RAMNOLIPÍDEOS, DI-RAMNOLIPÍDEOS E DE EXTRATO BRUTO ORGÂNICO DE FERMENTAÇÕES SÓLIDAS	89
TABELA 19 -	EFEITO DA AUTOCLAVAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (121°C POR 15 MIN) NAS PROPRIEDADES TENSOATIVAS	90
TABELA 20 -	EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DA FONTE DE CARBONO NAS TAXAS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	94
TABELA 21 -	CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS DESEMPENHADOS PELOS PRODUTOS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR PAO1 APÓS 30 HORAS DE CULTIVO NA PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO.....	105
TABELA 22 -	CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS DESEMPENHADOS PELOS PRODUTOS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR PAO1 APÓS 48 HORAS DE CULTIVO NA PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO.....	106
TABELA 23 -	GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO	107
TABELA 24 -	GENES QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE PEQUENAS MOLÉCULAS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO	111
TABELA 25 -	GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO	116
TABELA 26 -	GENES QUE CODIFICAM REGULADORES TRANSCRICIONAIS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO	118
TABELA 27 -	GENES QUE CODIFICAM PARA BIOSÍNTESE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO	121

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CMC	Concentração Micelar Crítica
DO	Densidade Óptica
<i>E</i>	Índice de Emulsificação
FES	Fermentação no Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
HSL	Homoserinolactonas
LB	Meio de cultura Luria Bertani
QS	<i>Quorum sensing</i>
R ₁ C ₁₀ C ₁₀	Representação de um L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxi-decanoato
R ₂ C ₁₀ C ₁₀	Representação de um L-ramnosil-L-ramnosil-β-hidroxidecanoil-β-hidroxi-decanoato
TS	Tensão superficial
TSA	Ágar Trípico de Soja
t ₃₀	Trinta horas de cultivo
t ₄₈	Quarenta e oito horas de cultivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. SURFACTANTES BIOLÓGICOS, UMA ALTERNATIVA PARA OS SURFACTANTES DE ORIGEM QUÍMICA?.....	20
2.2. BIOSURFACTANTES	23
2.2.2. Produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em fermentação submersa	27
2.2.3. A produção de ramnolipídeos pelo método de fermentação submersa clássica é problemática.....	29
2.2.4. Fermentação em estado sólido, uma alternativa para produção de ramnolipídeos?	31
2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	32
2.4. BIOSÍNTESE DOS RAMNOLIPÍDEOS	33
2.4.1. A influência do sistema <i>quorum sensing</i> na biossíntese dos ramnolipídeos	36
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. MICRORGANISMO.....	41
4.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	42
4.2.1. Preparo do inóculo.....	42
4.2.2. Preparo dos cultivos para Fermentação em Estado Sólido	42
4.2.3. Extração dos ramnolipídeos	44
4.2.4. Otimização da produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 em Fermentação em Estado Sólido	44
4.2.5. Otimização da produção de ramnolipídeos por metodologia de superfície de resposta	44
4.3. EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	47
4.3.1. Curva de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 em frascos Erlenmeyers	47
4.3.2. Curva de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 em Biorreator de 5 L (Bioflo-III Fermentor – New Brunswick Scientific)	48

4.3.3. Produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa	48
4.4. ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	49
4.4.1. Estudos fermentativos iniciais para seleção de condições de cultivo para os estudos de microarranjos.....	49
4.4.1.1 Preparo do inóculo.....	49
4.4.1.2. Curva de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	49
4.4.1.3. Produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	50
4.4.2. Coletas de amostras para obtenção de RNA.....	50
4.4.3. Etapa de lise celular	51
4.4.4. Extração do RNA	51
4.4.4. Tratamento do RNA total com DNase	52
4.4.5. Concentração do RNA total	52
4.4.6. Processamento do GeneChip genome array.....	53
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	53
4.5.1. Determinação do crescimento bacteriano	53
4.5.2. Determinação da tensão superficial.....	54
4.5.3. Determinação da Concentração Micelar Crítica	54
4.5.4. Medida do Índice de Emulsificação (E).....	55
4.5.5. Quantificação dos ramnolipídeos.....	55
4.5.6. Medição de pH.....	56
4.5.7. Determinação da umidade dos substratos sólidos	56
4.5.8. Purificação das frações mono e di-ramnolipídicas.....	57
4.5.9. Cromatografia em camada delgada.....	57
4.5.10. Quantificação de RNA por Fluorimetria	57
4.5.11. Eletroforese em gel de agarose.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. CURVA DE CRESCIMENTO de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM FRASCOS ERLLENMEYERS E EM BIORREATOR.....	59
5.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR61	
5.3. ESTUDO DE SELEÇÃO DE VARIÁVEIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	63
5.3.1. Modificações na solução umedecedora.....	63
5.3.2. Efeito dos açúcares residuais presentes no bagaço de cana-de-açúcar e do aumento da concentração de glicerol na solução umedecedora	63
5.3.3. Utilização de óleos vegetais como fonte de carbono e indutor	65
5.3.4. Estudo de variáveis do processo	66
5.3.5. Influência do crescimento prévio do microrganismo em fermentação submersa e da concentração de glicerol em FES utilizando bagaço de cana e farelo de girassol como substratos	69

5.4. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	70
5.5. DELINEAMENTO FATORIAL DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE GIRASSOL COMO SUBSTRATO SÓLIDO.....	71
5.6. A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE GIRASSOL SUPLEMENTADO COM SAIS E GLICEROL MOSTROU-SE VIÁVEL	74
5.7. SELEÇÃO DE OUTROS SUBSTRATOS SÓLIDOS PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS	76
5.8. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO COMO SUBSTRATO	78
5.9. SUPLEMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO UMEDECEDORA COM ÓLEO DE SOJA .	79
5.10. DELINEAMENTO FATORIAL DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES UTILIZANDO A MISTURA DE SUBSTRATOS: BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO	80
5.11. A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO SUPLEMENTADOS COM SAIS, GLICEROL E ÓLEO DE SOJA TAMBÉM SE MOSTROU VIÁVEL.....	84
5.12. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES, EM ESCALA DE BANCADA, SUGEREM QUE FES EM LARGA ESCALA PARA PRODUÇÃO DESTES TENSIOATIVOS É TECNICAMENTE VIÁVEL	85
5.13. CARACTERIZAÇÃO E PROCESSOS “DOWNSTREAM” DOS RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR FES.....	86
5.13.1 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	86
5.13.2 Determinação do índice de emulsificação (E).....	87
5.13.3 Determinação da concentração micelar crítica (CMC) e do índice de emulsificação (E) das frações mono e di-ramnolipídicas purificadas.....	88
5.13.4. Efeito do tratamento térmico nas propriedades tensoativas dos ramnolipídeos	90
5.13.5. Propriedades tensoativas dos ramnolipídeos produzidos por FES.....	91
5.14. ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	92
5.14.1 Estudos iniciais: teste com diferentes fontes de carbono para a produção de ramnolipídeos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	93
5.14.2 Escolha das condições teste e controle para os ensaios de microarranjo....	96
5.14.3 Produção de ramnolipídeos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 em meio de cultivo suplementado com caseinato de sódio.....	97
5.14.4 Identificação de genes com expressão diferencial na presença e ausência de caseinato de sódio	98

5.14.5 Identificação de genes envolvidos em diferentes processos fisiológicos, com expressão diferencial em resposta à presença de caseinato de sódio no meio de cultivo.....	101
5.14.6 Efeito da suplementação de caseinato de sódio no meio de cultivo na biossíntese de ramnolipídeos e na expressão dos genes do sistema <i>quorum sensing</i>	122
5.14.7 Cinética da expressão dos genes relacionados com a biossíntese de ramnolipídeos	124
5.14.7.1 Ramnosiltransferase 1 e 2	126
5.14.7.2 Biossíntese de novo de ácidos graxos.....	127
5.14.7.3 Sistema <i>quorum sensing</i>	128
5.14.7.4 Função da RhIG na biossíntese dos ramnolipídeos.....	129
5.14.8 Considerações sobre o transcriptoma de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 durante a produção de ramnolipídeos por fermentação submersa.....	130
6. CONCLUSÕES.....	131
6.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES	131
6.2. ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	133
7. ETAPAS FUTURAS.....	134
7.1. CORRELACIONADAS COM O ESTUDO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES.....	134
7.2. CORRELACIONADAS COM ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	136
7.3. CORRELACIONADAS COM A INTERAÇÃO DOS ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES E COM O TRANSCRIPTOMA DE <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	137
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
9. ANEXOS	153

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial das interfaces óleo/água ou ar/água. Estes compostos apresentam aplicações no aumento da biodegradação e na remoção de poluentes de baixa solubilidade (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; MULLIGAN, 2009). Atualmente, a maior parte dos surfactantes no mercado é de origem química. Entretanto, o aumento no interesse de preservação ambiental tem conduzido à utilização dos surfactantes de origem biológica (NITSCHKE *et al.*, 2005a,b), pois estes apresentam alta aceitabilidade ecológica, baixa toxicidade, e são biodegradáveis (KARANTH, *et al.*, 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; COSTA *et al.*, 2006). Os surfactantes de origem biológica, os chamados “biossurfactantes”, apresentam seu maior potencial de aplicação em condições onde se faz necessária a dispersão de tensoativos no meio-ambiente, especificamente na limpeza de derramamentos de óleo e compostos hidrofóbicos e no aumento da recuperação de óleo de reservatórios (MULLIGAN, 2009; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Os ramnolipídeos, glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, são uma das mais importantes classes de biossurfactantes. Eles estão entre os surfactantes microbianos mais estudados, porque possuem excelentes propriedades tensoativas e podem ser produzidos em altas concentrações (LEE *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2007; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010; MULLIGAN, 2009). Os estudos de produção de ramnolipídeos vêm sendo conduzidos em fermentação submersa. No entanto, a fermentação submersa, em reatores pilotos ou de larga escala, enfrenta um problema severo quando utilizada para produzir tensoativos. Os processos são conduzidos com agitação e aeração forçada, de forma que, quando o biossurfactante começa a ser produzido, grandes quantidades de espuma são formadas. Assim, se a formação de espuma não for contida, a fermentação fica altamente prejudicada, pela perda de biomassa, nutrientes e produtos contidos na espuma que sai do reator, o que diminui os índices de produção ou em casos extremos inviabilizam o processo (LEE; KIM, 2004; YEH *et al.*, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010). Basicamente, duas estratégias têm sido utilizadas para combater a formação de espuma em

fermentação submersa: “química”, que envolve a adição de agentes anti-espumantes no meio de cultivo ou “mecânica”, que envolve o uso de aparelhos projetados para quebrar a espuma. No entanto, estas estratégias apresentam um alto custo e não são completamente eficientes, o que tem contribuído para falta de processos de produção em escala comercial de ramnolipídeos (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010). Dentro deste contexto, a proposta desta tese foi utilizar a fermentação em estado sólido (FES) como uma forma alternativa para se produzir ramnolipídeos. A FES é um processo de fermentação que envolve o cultivo de microrganismos em superfícies de partículas orgânicas úmidas, na ausência ou quase ausência de água livre (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Adicionalmente pode se dizer, que na obtenção de certos produtos microbianos, a FES pode apresentar vantagens sobre a fermentação submersa (MITCHELL; VON MEIEN, 1999; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). No caso da produção de ramnolipídeos, a FES apresenta o potencial de se evitar a formação de espuma, sem onerar o processo (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica serão abordadas as características relevantes dos surfactantes, biosurfactantes e ramnolipídeos. Adicionalmente, serão revisados os tópicos: i) produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentação submersa, onde serão mostradas quais as estratégias de produção que vêm sendo utilizadas e os níveis de produção obtidos por esta, que é a tecnologia clássica de produção de ramnolipídeos; e ii) a tecnologia de fermentação em estado sólido (FES), com suas vantagens e potencial de aplicação para produção de ramnolipídeos; e iii) a biossíntese de ramnolipídeos, sua regulação, e as vias metabólicas diretamente correlacionadas com a biossíntese de ramnolipídeos.

2.1. SURFACTANTES BIOLÓGICOS, UMA ALTERNATIVA PARA OS SURFACTANTES DE ORIGEM QUÍMICA?

Os surfactantes são uma importante classe de moléculas compostas por domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, com atividade de diminuição de tensão superficial e interfacial em soluções aquosas. Estes compostos são utilizados em quase todos os setores da indústria moderna (Tabela 1) (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; MULLIGAN, 2009). A maior parte comercialmente disponível é de origem química, sendo esta, principalmente, produzida a partir de derivados de petróleo (BANAT *et al.*, 2000; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Os indicadores usualmente utilizados para aferir a atividade de um surfactante são os parâmetros de diminuição da tensão superficial e diminuição da tensão interfacial, assim como a concentração micelar crítica (CMC). A CMC é definida como a mínima concentração de surfactante em solução necessária para formação de micelas. A capacidade de formar micelas confere aos surfactantes as propriedades de detergência e solubilização de compostos hidrofóbicos (Figura 1). Este parâmetro indica o poder de redução de tensão superficial e interfacial do tensoativo, e quanto menor o valor de CMC maior é a eficiência do surfactante, em outras palavras, menores concentrações de

surfactante serão necessárias para proporcionar o abaixamento de tensão (MULLIGAN, 2001, 2005; CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

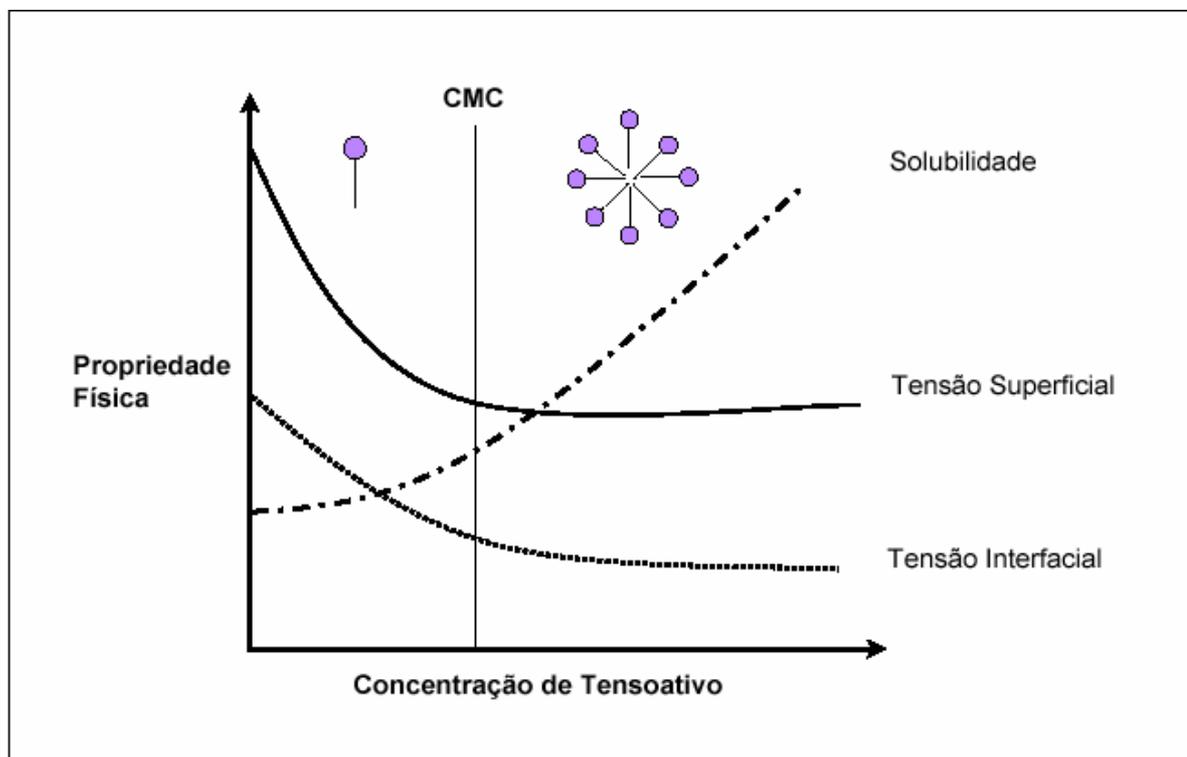


FIGURA 1 -DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA VARIAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL, INTERFACIAL E DA SOLUBILIDADE DE COMPOSTO ORGÂNICO COM A CONCENTRAÇÃO DO TENSOATIVO

Fonte: Adaptada (MULLIGAN, 2001).

Entre as aplicações dos surfactantes (Tabela 1), duas se destacam pelo alto potencial e importância de aplicabilidade: (1) Utilização em limpeza de derramamentos de óleo e outros compostos hidrofóbicos (BANAT, 1995; MULLIGAN, 2005; BORDOLOI; KONWAR, 2009); (2) Utilização para aumentar a recuperação de óleo (petróleo) em reservatórios (BANAT, 1995). Nestas duas aplicações o uso de surfactantes de origem biológica é mais apropriado, uma vez que surfactantes químicos podem causar efeitos ambientais tóxicos (WEI *et al.*, 2005). Além disto, os subprodutos de síntese de surfactantes químicos são potencialmente nocivos ao meio-ambiente (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

TABELA 1 - SURFACTANTES E RAMOS INDUSTRIAIS DE APLICAÇÃO

Ramo	Aplicação	Função do biossurfactante
Industrial		
Petróleo	Recuperação	Redução da viscosidade de óleos, recuperação de óleo residual
	Melhorada de Petróleo (MEOR) De-emulsificante	De-emulsificação de emulsões, solubilização, redução da viscosidade, agente umectante
Ambiental	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos, agente seqüestrante de metais
	Remediação <i>Soil washing</i> , <i>Soil flushing</i>	Emulsificação por aderência ao hidrocarboneto, dispersante, agente de espuma, detergente
Biológico	Ingrediente funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos, agente protetor
	Microbiologia	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular
	Farmacêutica	Anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral, agentes penetrantes e umectantes
Agricultura	Biocontrole	Facilita mecanismos associados ao microrganismo como parasitismo, competição, resistência sistêmica induzida e hipo-virulência
Cosmética	Cosmética	Emulsificantes, agentes de espuma, solubilizadores, umectantes, agentes de limpeza

Fonte: Adaptada (SINGH *et al.*, 2007)

2.2. BIOSURFACTANTES

Os biossurfactantes microbianos constituem um grupo de diversas moléculas sintetizadas por bactérias, fungos e leveduras (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; NITSCHKE *et al.*, 2005a). Estes compostos oferecem diversas vantagens sobre seus congêneres de origem química, entre estas se destacam: (a) a alta aceitabilidade ecológica devido a baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (KARANTH, *et al.*, 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2006); (b) a efetividade em ampla faixa de temperatura e pH (BANAT *et al.*, 2000; MULLIGAN, 2005; PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008); (c) a possibilidade de serem produzidos a partir de fontes renováveis (BENINCASA *et al.*, 2002, 2008; NITSCHKE *et al.*, 2005b; GEORGE; JAYACHANDRAN, 2008; LIMA *et al.*, 2009); e (d) a maior eficiência uma vez que apresentam menores CMCs e maiores índices de emulsificação (BANAT, 1995; MULLIGAN, 2009).

Os biossurfactantes podem ser classificados em grupos baseado em suas características estruturais: (1) glicolipídeos; (2) lipopeptídeos e lipoproteínas; (3) ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídeos; e (4) surfactantes poliméricos. A Tabela 2 indica os principais biossurfactantes de cada um destes quatro grupos, e seus microrganismos produtores.

As próximas seções tratarão especificamente dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Os ramnolipídeos apresentam um conjunto de características e vantagens que lhe garantem uma posição singular entre tensoativos de origem biológica.

2.2.1. Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Trabalhos pioneiros de Jarvis e Johnson (1949) mostraram que a bactéria *P. aeruginosa* cultivada em meio utilizando glicerol como fonte de carbono produz um glicolipídeo com uma porção hidrofóbica composta de ácido graxo e a uma porção

hidrofílica composta por uma ou duas unidades de ramnoses. Mais tarde, foram reportados dois grupos de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*, os mono- e os di-ramnolipídeos (Figura 2), constituídos, respectivamente, de uma unidade de

TABELA 2 – PRINCIPAIS TIPOS DE BIOSSURFACTANTES E SEUS MICRORGANISMOS PRODUTORES

Biossurfactante	Microrganismo Produtor
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>T. apicola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: Adaptado (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

ramnose e duas de ácido β -hidroxidecanoato (C10) ou duas unidades de ramnose ligadas a duas unidades de ácido β -hidroxidecanoato (LANG; WAGNER, 1987). Também foi relatada a existência de ramnolipídeos que apresentam ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia (C8, C10, C14), com diferentes graus de insaturação (Tabela 3) (LANG; WULLBRANDT, 1999; SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2007).

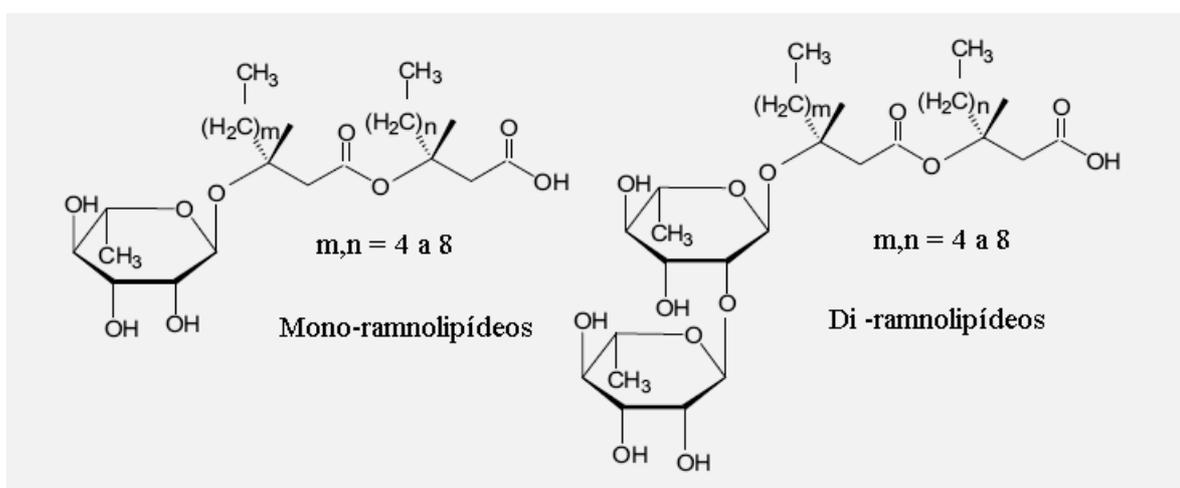


FIGURA 2 - RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Adaptado - (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005)

Os ramnolipídeos apresentam funções na motilidade (*swarming*) do microorganismo (CAIAZZA; SHANKS; O'TOOLE, 2005), na captação de substratos hidrofóbicos (NOORDMAN; JANSSEN, 2002; MULLIGAN, 2005) e na formação de biofilme (DAVEY; CAIAZZA; O'TOOLE, 2003). A biossíntese dos ramnolipídeos inicia-se no fim da fase exponencial, mas a máxima produção de ramnolipídeos ocorre na fase estacionária do ciclo de crescimento da bactéria (OCHSNER; REISER, 1995; DÉZIEL *et al.*, 2000). A biossíntese dos ramnolipídeos é transcricionalmente regulada pelo circuito *quorum-sensing* (OCHSNER; REISER, 1995; SCHUSTER; GREENBURG, 2006) e pós-transcricionalmente regulada pelo sistema RsmA/RsmZ (HEURLIER *et al.*, 2004).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS PELO GÊNERO *Pseudomonas*

Cepa	Tipo de ramnolipídeo	TS (mN/m)	CMC (mg/L)	Referências
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	RL misturas ^a	27,3	13,9	(MONTEIRO <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. aeruginosa</i> 47T2	RL misturas	32,8	108,8	(HABA <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. aeruginosa</i> AT10	R ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	28,8	105,0	ABALOS <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. aeruginosa</i> AT10	RL misturas ^b	27,3	234	(ABALOS <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. aeruginosa</i> AT10	RL misturas ^c	26,8	150	(ABALOS <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	RL misturas	24,0	120	(BENINCASA <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	R ₁ -C ₁₀ -C ₁₀	25,0	11	(PARRA <i>et al.</i> , 1989)
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	R ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	25,0	11	(PARRA <i>et al.</i> , 1989)
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	R ₁ -C ₁₀ -C ₁₀ + R ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	26,0	20	(PARRA <i>et al.</i> , 1989)
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RL mistura	28,0	20	(SYLDATK <i>et al.</i> , 1985)
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	R ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	27,0	10	(SYLDATK <i>et al.</i> , 1985)
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	R ₂ -C ₁₀	30,0	200	(SYLDATK <i>et al.</i> , 1985)
<i>P. aeruginosa</i> UG-2	R-C ₁₀ -C ₁₀ + R ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	31,0	53	(MATA-SANDOVAL <i>et al.</i> , 2001)

^a R₁-C₁₀-C₁₀; R₁-C₁₀-C₈; R₁-C₈-C₁₀; R₁-C₁₀-C_{12:1}; R₁-C₁₂-C₁₀; R₁-C₁₀-C₁₂; R₂-C₁₀-C₁₀; R₂-C₁₀-C₈; R₂-C₈-C₁₀; R₂-C₁₀-C_{12:1}; R₂-C₁₂-C₁₀; R₂-C₁₀-C₁₂,

^b R₁-C₁₀-C₁₀ + R₂-C₁₀-C₁₀ + R₁-C₁₀-C₁₂ + R₁-C_{12:1}-C₁₀ + R₁-C_{12:2} + R₁-C₈-C₂

^c R₂-C₁₀-C₁₀ + R₁-C₁₀-C₁₀ + R₂-C₁₀-C₁₂ + R₁-C₁₀-C₁₂ + R₁-C_{12:1}-C₁₀ + R₁-C_{8:2}

RL: ramnolipídeos, TS: tensão superficial, CMC: concentração micelar crítica

Fonte: Adaptado (NITSCHKE *et al.*, 2005a; SOBERÓN-CHAVEZ, 2005; DÉZIEL *et al.*, 2000)

Os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* estão entre os biossurfactantes mais estudados (LEE *et al.*, 2004, KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010; MULLIGAN, 2009). O interesse por estes compostos é motivado por um conjunto de características e vantagens, tais como: possuírem excelentes propriedades tensoativas (WEI *et al.*, 2005, MONTEIRO *et al.*, 2007; PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008); serem produzidos em altas concentrações (LINHARDT *et al.*, 1989; TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003); serem produzidos a partir de fontes de baixo custo, incluindo substratos hidrofílicos (carboidratos) e hidrofóbicos (óleos vegetais, hidrocarbonetos) (HOLMBERG, 2001) ou mesmo efluentes de indústrias de alimentos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; NITSCHKE *et al.*, 2005b; GEORGE; JAYACHANDRAN, 2008; LIMA *et al.*, 2009).

Os ramnolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25 a 30 mN/m, com uma CMC de 10 a 200 mg/L (Tabela 3). Os ramnolipídeos não são os biossurfactantes mais eficientes, ou seja, não apresentam a maior redução da tensão superficial ou a menor CMC. Por outro lado, estes tensoativos apresentam alta atividade emulsificante e uma pequena atividade antibiótica, além de serem menos retidos no solo do que os surfactantes químicos. Assim, apresentam-se como uma excelente alternativa de tensoativo para aplicação em biorremediação (BORDAS *et al.*, 2005; MULLIGAN, 2005, 2009).

2.2.2. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentação submersa

Todos os estudos de produção de ramnolipídeos relatados na literatura antes deste trabalho foram feitos em fermentação submersa, alguns destes trabalhos estão citados na Tabela 4.

A quantidade de ramnolipídeos produzida por fermentação submersa varia conforme o tipo e a escala de processo, o meio e as condições de cultivo utilizadas. Diferentes fontes de carbono, tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, têm sido utilizadas para a produção de ramnolipídeos por diferentes cepas de *P. aeruginosa*

TABELA 4 - PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Cepa	Fonte carbono	Ramnolipídeos (g/L)	Referências
<i>P. aeruginosa</i> DSM	glucose	2,3 g/L	(REILING <i>et al.</i> , 1986)
<i>P. aeruginosa</i> ^a	glicerol	3,2 g/L	(SANTA ANNA <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	glicerol	3,9 g/L	(MONTEIRO <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. aeruginosa</i> EM1	glucose+glicerol	12,6 g/L	(WU <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	glicerol	15,9 g/L	(SANTANA FILHO, 2009)
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	etanol	32,0 g/L	(MATSUFUJI; NAKATA; YOSHIMOTO, 1997)
<i>P. aeruginosa</i> LBM10	óleo de soja	1,4 g/L	(PRIETO <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. aeruginosa</i> PACL	óleo de fritura	3,3 g/L	(LIMA <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. aeruginosa</i> DS10-129	óleo de soja	4,3 g/L	(RAHMAN <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	óleo de girassol	4,9 g/L	(BENINCASA <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	óleo de oliva	5,3 g/L	(BENINCASA <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	soapstock	11,7 g/L	(NITSCHKE <i>et al.</i> , 2005b)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	soapstock ^c	15,9 g/L	(BENINCASA <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> ^b	óleo de peixe	22,7 g/L	(LEE <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. aeruginosa</i> UW-1	óleo de canola	24 g/L	(SIM; WARD; LI, 1997)
<i>Pseudomonas sp.</i> DSM 2874	óleo de canola	45,0 g/L	(TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK , 2003)
<i>P. aeruginosa</i> UI 29791	óleo de milho	46,0 g/L	(LINHARDT <i>et al.</i> , 1987)

^a *P. aeruginosa* isolada de água de lavagem de poços de petróleo do Nordeste do Brasil.

^b *P. aeruginosa* isolada de água do mar da Coréia.

^c subproduto obtido a partir do resíduo do refino do óleo de soja bruto.

(Tabela 4). Entre as fontes de carbono, os triacilgliceróis parecem ser os melhores indutores para produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* (Tabela 4).

Existe uma inconstância na forma que os resultados de produção são apresentados nas publicações. Alguns autores reportam a produção por equivalentes de ramnose, enquanto outros por concentração de ramnolipídeos. Nem sempre é possível de se identificar qual é a base (ramnose ou ramnolipídeos) que a produção é reportada. Note que a molécula de ramnolipídeo (Figura 1) é composta por uma fração lipídica e outra de glicídica (ramnose). A massa dos ramnolipídeos é de 3 a 3,4 vezes superior à massa de ramnose obtida (ITOH *et al.*, 1970; BENINCASA *et al.*, 2002). Assim o resultado de um autor que está reportando a concentração de ramnolipídeos por equivalentes de ramnose seria pelo menos 3 vezes superior se o mesmo a reportasse em massa de ramnolipídeos.

Na literatura podem ser encontrados níveis de produção de ramnolipídeos por fermentação submersa na ordem de: 46 g/L, utilizando óleo de milho como fonte de carbono em batelada em reator (LINHARDT *et al.* 1989); 45 g/L, com óleo de canola em batelada alimentada em reator (TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003); 32 g/L, utilizando etanol como fonte de carbono em batelada alimentada em frascos Erlenmeyers (MATSUFUJI; NAKATA; YOSHIMOTO, 1997); 24 g/L, com óleo de canola em batelada em frascos Erlenmeyers (SIM; WARD; LI, 1997); 22,7 g/L, com óleo de peixe em batelada alimentada, em frascos Erlenmeyers (LEE *et al.*, 2004).

2.2.3. A produção de ramnolipídeos pelo método de fermentação submersa clássica é problemática

Atualmente, apesar do grande potencial de aplicação, não existe nenhum processo industrial de produção de ramnolipídeos. A companhia americana Jeneil (Jeneil Biosurfactant Company – Saukville, WI) há alguns anos estabeleceu uma planta de produção de ramnolipídeos por fermentação submersa, mas após um curto período de funcionamento esta foi desativada.

A fermentação submersa enfrenta um problema severo quando utilizada para produzir tensoativos. Os processos são conduzidos com agitação e aeração forçada. Assim, quando o biossurfactante começa a ser produzido, grandes quantidades de espuma são formadas, e há uma tendência das células do microrganismo produtor, nutrientes e produto acumularem-se nesta espuma. Assim, se faz necessário à utilização de métodos de contenção de formação de espuma, pois esta prejudica intensamente o processo. Há uma tendência da espuma sair do reator e conseqüentemente carregar nutrientes, produtos e biomassa. A efetividade do sistema ou da estratégia de contenção é essencial para garantir a viabilidade do processo, uma vez que a intensa formação de espuma acarreta em perda de rendimento e produtividade, além de gerar dificuldades operacionais (LEE; KIM, 2004; YEH *et al.*, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Basicamente, duas estratégias têm sido utilizadas para combater a formação de espuma em fermentação submersa: “química” ou “mecânica”. A estratégia química envolve a adição de agentes anti-espumantes no meio de cultivo. Entretanto, isto traz três desvantagens. Primeiro, os anti-espumantes mais eficientes (misturas orgânicas a base de polipropileno ou polímeros a base de silicone) são de alto custo e seu uso encarece o processo. Segundo, os anti-espumantes interferem na transferência de O_2 e CO_2 entre as fases líquida e gasosa e podem provocar reações inibitórias e efeitos tóxicos ao microrganismo. Terceiro, os anti-espumantes representam um “contaminante químico” que tem que ser separado do produto final, o que encarece o processo ainda mais (LEE; KIM, 2004; YEH *et al.*, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Por outro lado, a estratégia mecânica envolve o uso de aparelhos projetados para quebrar a espuma. Os chamados “quebradores de espuma” instalados no “headspace” (no eixo do agitador) podem ser efetivos em combater espuma durante a produção de outros compostos, mas apresentam capacidade limitada de contenção de espuma formada por biossurfactantes, pois não são efetivos para grandes quantidades de espuma. Assim, é necessário instalar “quebradores externos com sistema coletor” de forma que haja a possibilidade de recuperação da espuma formada (contendo biomassa, nutrientes e o tensoativo), e que esta seja convertida em líquido e este devolvido ao reator. Este sistema encarece

significativamente a construção do biorreator, especialmente porque esta operação deve ser feita assepticamente. Assim, os métodos físicos também podem acarretar na diminuição da eficiência do processo de fermentação, uma vez que o processo de produção passa a apresentar um maior número de etapas. (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Dados os efeitos deletérios da formação de espuma durante a produção de biossurfactantes, somados aos altos custos e a não completa eficiência das estratégias de controle de formação de espuma, a produção de ramnolipídeos por fermentação submersa ainda não é comercialmente viável.

2.2.4. Fermentação em estado sólido, uma alternativa para produção de ramnolipídeos?

Muito pouco foi estudado da produção de biossurfactantes em fermentação em estado sólido (FES). A produção do biossurfactante surfactina por *Bacillus subtilis* RB14 em FES foi estudada por Ohno, Ano e Shoda (1995a). Estes pesquisadores utilizaram como substrato o resíduo sólido da produção do extrato de soja (*okara*), e obtiveram surfactina em uma concentração de 2,0 g/kg. Mais recentemente, Veenanadig, Gowthaman e Karanth (2000) estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* FE-2 em biorreator de FES utilizando farelo de trigo como substrato. Neste estudo obtiveram uma redução de tensão superficial de 54 mN/m para 24 mN/m quando o extrato da fermentação foi adicionado a água. Duas cepas termofílicas de *B. subtilis* cultivadas em resíduos de casca de batata foram utilizadas para produção de surfactina, e o melhor resultado obtido foi de 92 g/kg de sólido seco (DAS; MUKHERJEE, 2007). A produção de lipopeptídeos por *B. pumilus* em FES foi estudada por Bugay (2009). *Okara* e uma mistura de *okara* e espuma de polipropileno foram utilizados como substratos sólidos neste trabalho; o nível de produção para ambos foi em torno de 0,4 g/kg de sólido seco (BUGAY, 2009).

A FES é uma tecnologia simples aplicada nos estudos, sobretudo em escala de bancada, de produção de compostos interesse (VEENANADIG *et al.*, 2000; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Esta tecnologia tem o potencial de viabilizar a produção de ramnolipídeos, pois é uma alternativa de se evitar a formação de espuma, fator limitante da obtenção desses compostos por fermentação submersa (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2009).

2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) envolve o cultivo de microrganismos nas superfícies de partículas orgânicas úmidas, dentro de um leito em que há uma fase gasosa contínua nos poros entre as partículas sólidas (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Há um mínimo de água líquida nestes poros, sendo restrita a filmes finos nas superfícies das partículas e umas poucas gotículas. A água necessária para o crescimento do microrganismo encontra-se absorvida dentro das partículas do substrato. O ambiente fornecido ao microrganismo neste sistema é bem diferente daquele fornecido pela fermentação submersa. A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de alguns metabólitos específicos, que não seriam produzidos na fermentação submersa, além de possibilitar, em alguns casos, uma maior produtividade volumétrica e um maior rendimento em relação a fermentação submersa (MOO-YOUNG; MOREIRA; TENGARDY, 1983; MITCHELL *et al.*, 1992; SATO; SUDO, 1999). Outra vantagem associada a FES é a possibilidade de obtenção de extratos mais concentrados, facilitando o processo de purificação do metabólito de interesse (MITCHELL *et al.*, 2000; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000; MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003).

Além dos lipopeptídeos mencionados acima, a FES tem sido utilizada para a produção de uma variedade grande de produtos microbianos, incluindo metabólitos secundários biologicamente ativos (toxinas, antibióticos), enzimas, cogumelos, ácidos orgânicos, aminoácidos, na alimentação (laticínios, aromas), vitaminas, etanol e biopesticidas (HÖLKER; LENZ, 2005; VANDENBERGHE *et al.*, 2000; PANDEY, 2003).

Os substratos tipicamente utilizados na FES são de origem agroindustrial, subprodutos ou produtos agrícolas propriamente ditos processados ou não. Grãos de arroz, raízes de mandioca, soja, farelo de arroz, farelo de trigo, fubá, casca de arroz e casca de trigo, entre outros, podem ser utilizados como substratos (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002).

2.4. BIOSÍNTESE DOS RAMNOLIPÍDEOS

Segundo a via putativa descrita por Burger, Glaser e Burton (1963), a biossíntese dos ramnolipídeos ocorre através de reações de transferências seqüenciais de grupos glicosil. Cada reação é catalisada por uma enzima específica, sendo dTDP-L-ramnose o doador do grupo ramnosil e o β -D-hidroxicanoiloxi- β -D-alcanoato ou L-ramnosil- β -D-hidroxicanoiloxi- β -D-alcanoato os aceptores do grupo ramnosil (Figura 3).

Mais recentemente, através da estratégia de se criar cepas de *P. aeruginosa* mutantes (através do *knock-out* de genes específicos) e a verificação se estas eram capazes de produzir di-ramnolipídeos ou ambos mono e di-ramnolipídeos, identificou-se os genes responsáveis por etapas da biossíntese de ramnolipídeos. Os primeiros genes identificados foram os do operon *rhlAB* (OCHSNER; FIECHTER; REISER, 1994). A idéia inicial apresentada por Ochsner, Fiechter e Reiser (1994) foi que o produto de *rhlAB* seria o complexo ramnosiltransferase 1, que envolveria um heterodímero RhlAB. Estes autores estudaram a expressão destes genes e caracterizaram o operon *rhlAB* de *P. aeruginosa* expresso em *E. coli*. Em adição, estes pesquisadores utilizaram mutantes de *P. aeruginosa* com *rhlA* ou *rhlB* deletados, e mostraram que ambos os mutantes apresentaram perda de produção de ramnolipídeos. Mais recentemente, Déziel *et al.* (2003) mostraram que mutantes com *rhlA* e *rhlB* deletados não produzem ramnolipídeos, no entanto, mutantes com apenas *rhlB* deletado ainda são capazes de produzir β -D-hidroxicanoiloxi- β -D-alcanoato (HAA), o que indicou que RhlA é requerida para formação da porção HAA dos ramnolipídeos, enquanto RhlB apresenta a atividade de ramnosiltransferase. Rahim *et al.* (2001) mostraram que mutantes de *P. aeruginosa* com *rhlC* deletado

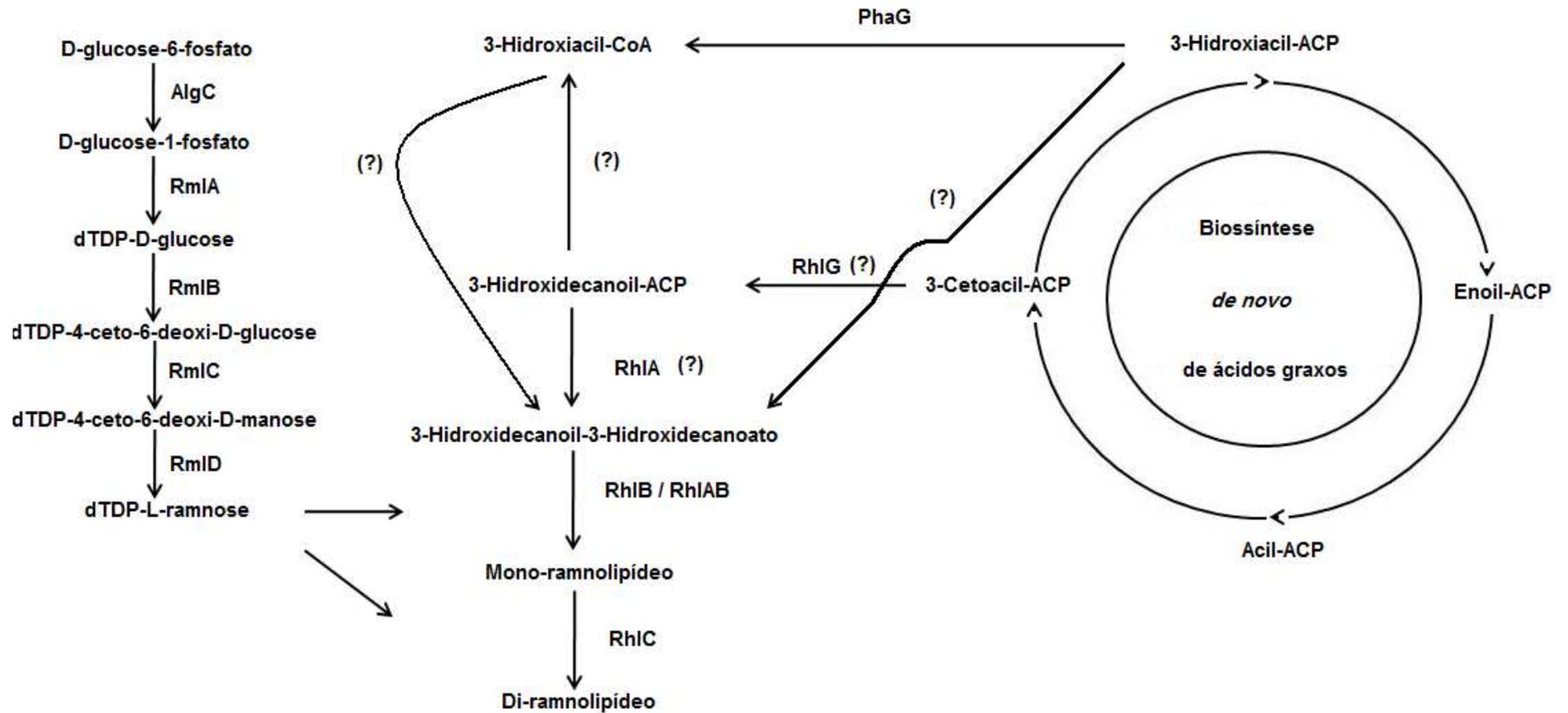


FIGURA 3 – BIOSÍNTESE DOS RAMNOLIPÍDEOS

Fonte: Adaptado – (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998; MAIER; SOBERÓN-CHAVÉZ, 2000; REHM; MITSKY; STEINBÜCHEL, 2001; DÉZIEL *et al.*, 2003; SOBERÓN-CHAVÉZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005; MILLER *et al.*, 2006; ZHU; ROCK, 2008).

produzem mono-ramnolipídeos mas não produzem di-ramnolipídeos, indicando que RhIC apresenta atividade de ramnosiltransferase 2, enzima que adiciona a segunda molécula de ramnose nos mono-ramnolipídeos, formando os di-ramnolipídeos.

A biossíntese da dTDP-L-ramnose, fonte das hexoses adicionadas ao HAA pela ramnosiltransferase 1 e 2, tem como precursor a glucose-1-fosfato, e ocorre em uma seqüência de reações catalisadas pelas enzimas codificadas pelo operon *rmIBCAD* (MAIER; SOBERÓN-CHAVÉZ, 2000; SOBERÓN-CHAVÉZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005) (Figura 3). A formação do precursor inicial dessa via é catalisada pela AlgC através de uma atividade de fosfo-gluco-mutase que converte a glucose-6-fosfato em glucose-1-fosfato (OLVERA *et al.*, 1999).

A porção lipídica dos ramnolipídeos é proveniente da biossíntese *de novo* dos ácidos graxos (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998; MAIER; SOBERÓN-CHAVÉZ, 2000; DÉZIEL *et al.*, 2003; SOBERÓN-CHAVÉZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005) (Figura 3). Não há indícios que intermediários da beta-oxidação possam ser utilizados (ZHU; ROCK, 2008). No entanto, ainda não é bem definido qual intermediário é retirado da via de síntese dos ácidos graxos e qual é a enzima que está relacionada com a referida retirada deste precursor (Figura 3). Campos-Garcia *et al.* (1998) mostraram que mutantes *rhIG*-negativos apresentam perda de produção de ramnolipídeos. Segundo estes pesquisadores, o gene *rhIG* de *P. aeruginosa* codifica uma β -cetoacil redutase NADPH-dependente requerida para síntese da porção β -hidroxiácido dos ramnolipídeos. Assim, eles propuseram que o intermediário β -cetoacil-ACP (Figura 3) é convertido em β -hidroxiacil-ACP pela RhIG (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998). O β -hidroxiacil-ACP, por sua vez, é convertido à 3-(3-hidroxi)alcanoato pela RhIA (DÉZIEL *et al.*, 2003). Por outro lado, segundo Zhu e Rock (2008), RhIG não apresenta nenhuma função na síntese dos ramnolipídeos, uma vez que, nos experimentos destes pesquisadores, mutantes *rhIG*-negativos apresentaram os mesmos níveis de produção de ramnolipídeos das correlatas estirpes selvagens. Ainda, segundo estes pesquisadores, é a enzima RhIA que capta diretamente o β -hidroxiacil-ACP da biossíntese dos ácidos graxos. Adicionalmente, o que pode ser dito, até o presente momento, é que RhIA é essencial para formação de HAA e dos ramnolipídeos, mas que não é possível afirmar qual é a real função desta enzima na

biossíntese dos ramnolipídeos. A elucidação da função de RhlG está ainda mais distante, uma vez que não se tem nem mesmo um consenso se realmente esta enzima está ou não envolvida na síntese dos ramnolipídeos.

2.4.1. A influência do sistema *quorum sensing* na biossíntese dos ramnolipídeos

O sistema *quorum sensing* (QS) é o principal sistema de comunicação e cooperação de procariotos. Neste sistema a bactéria produz moléculas sinalizadoras difusíveis que permitem a coordenação do comportamento do grupo. Assim, o sistema QS permite que as bactérias percebam a densidade da população bacteriana e, através dessa informação, possam regular da expressão de vários genes (SMITH; IGLEWSKI, 2003; SCHUSTER; GREENBERG, 2006; SANDOZ *et al.*, 2007). No QS de *P. aeruginosa* existem duas moléculas sinalizadoras do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL): N-(3-oxododecanoil)-HSL e N-butilil-HSL, produzidas pelas enzimas LasI e RhII, respectivamente (Figura 4). As moléculas de acil-HSL ligam-se aos relativos fatores de transcrição (LasR e RhIR), ativando a expressão dos genes alvos. Os dois circuitos são arranjados hierarquicamente, assim LasI-LasR controla positivamente a expressão de RhII-RhIR (Figura 4) (SCHUSTER; GREENBERG, 2006; GILBERT *et al.*, 2009).

O locus *rhl* no cromossomo de *P. aeruginosa* contém o operon *rhlAB* que codifica a ramnosiltransferase 1, enzima responsável pela formação dos mono-ramnolipídeos (Figura 4) (RAHIM *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2003) e *rhlI-rhIR*, que compõe um dos circuitos do sistema *quorum sensing* (QS) (Figura 4). Estes genes são transcritos na mesma direção, mas com *rhlAB* sendo transcrito independentemente de *rhlI* e *rhIR* (RAHIM *et al.*, 2001). O operon *rhlAB* é estritamente regulado por QS, enquanto *rhlC*, que tem como produto de sua expressão a ramnosiltransferase 2, tem sua transcrição coordenadamente regulada com *rhlAB* pelo mesmo sistema (RAHIM *et al.*, 2001). A biossíntese da ramnose adicionada ao HAA também sofre influência do QS. Segundo os estudos do transcriptoma de *P. aeruginosa*, na biossíntese da ramnose (Figura 3), tanto o

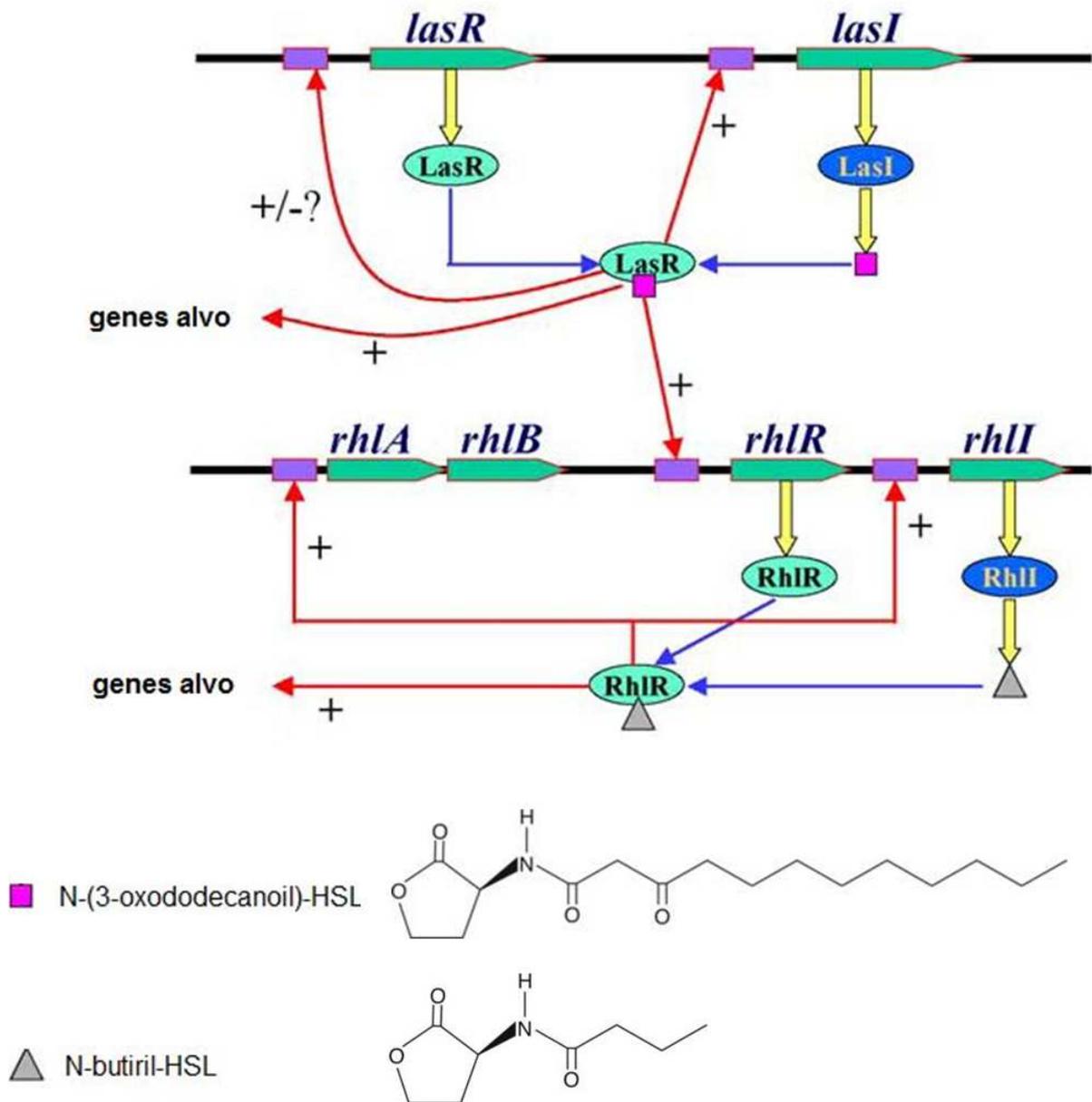


FIGURA 4 – SISTEMA QUORUM SENSING DE *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Adaptado – (CHEN *et al.*, 2005)

operon *rmIBCAD* (MAIER; SOBERÓN-CHAVÉZ, 2000; SOBERÓN-CHAVÉZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005) como a AlgC (OLVERA *et al.*, 1999) apresentam transcrição promovida pelo QS (SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003; HENTZER *et al.*, 2003).

Adicionalmente, vários estudos têm mostrado uma correlação entre a transição da fase exponencial para a fase estacionária do ciclo de crescimento de *P. aeruginosa* com a expressão dos genes dos circuitos do QS (SCHUSTER *et al.*, 2004; SCHUSTER; GREENBERG, 2007; VAN DELDEN, *et al.*, 2001; ALVAREZ-ORTEGA; HARWOOD, 2007; SANDOZ *et al.*, 2007). A máxima produção dos ramnolipídeos ocorre na fase estacionária, e fatores como baixos níveis de crescimento, escassez de nutrientes e microaerofilia estão diretamente correlacionados com altos níveis de expressão de genes QS-induzidos (SANDOZ *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Como relatado na revisão bibliográfica, a fermentação submersa enfrenta um problema severo com a formação de espuma, quando utilizada para produzir tensoativos. Os efeitos deletérios da formação de espuma, assim como os altos custos e a não completa eficiência das estratégias de controle de formação de espuma têm contribuído para a falta de processos de produção de ramnolipídeos em escala comercial. Considerando o potencial de aplicação e a demanda destes compostos, existe uma grande necessidade de se viabilizar a produção destes tensoativos. Muito pouco foi estudado da produção de biossurfactantes por FES, e nada especificamente sobre a produção de ramnolipídeos neste sistema, mas a utilização desta tecnologia parece ser uma boa alternativa para se evitar a formação de espuma durante a fermentação, sem um significativo incremento no custo total do processo. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um processo de produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido, visando a obtenção de níveis de produção comparáveis aos obtidos por fermentação submersa. Durante o desenvolvimento do trabalho, ficou evidenciado o potencial papel do sistema *quorum sensing* na regulação da produção de ramnolipídeos. Desta maneira, para investigar este papel também foi feito um estudo do transcriptoma de *P. aeruginosa* crescendo na presença ou na ausência de caseinato de sódio no meio de cultivo.

Estes objetivos foram alcançados através do planejamento e execução de experimentos baseados nos seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver metodologia de quantificação dos ramnolipídeos produzidos por FES;
- Selecionar os substratos com maior potencial para produção de ramnolipídeos;

- Desenvolver um processo de produção de ramnolipídeos por FES, assim como a extração e purificação destes;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos ramnolipídeos produzidos por FES;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das frações isoladas de mono- e di-ramnolipídeos produzidos por FES;
- Otimizar os parâmetros dos cultivos sólidos;
- Estudar, através de ensaios de microarranjos, a biossíntese dos ramnolipídeos e a relação desta com o sistema *quorum sensing* de *P. aeruginosa*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: 1) *P. aeruginosa* UFPEDA 614, originalmente isolada de uma planta petroquímica em Canto do Amaro, Rio Grande do Norte, gentilmente cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. Esta cepa já vem sendo utilizada para estudos de produção de ramnolipídeos no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (SANTANA FILHO, 2009; MONTEIRO, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2007; MEIRA, 2007); e 2) *P. aeruginosa* PAO1, cepa originalmente isolada na Austrália a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). PAO1 é a cepa de *P. aeruginosa* mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais, adicionalmente apresenta o genoma seqüenciado e publicado (STOVER *et al.*, 2000) assim como, existe no mercado *microarray chip* comercialmente disponível (Affymetrix GeneChip®). A cepa UFPEDA 614 foi mantida em meio líquido Luria Bertani (LB) (composição por litro: 10 g NaCl, 10 g triptona e 5 g extrato de levedura) adicionado de glicerol (40 %, v/v) e estocada a -18 °C, enquanto a cepa PAO1 foi mantida em meio líquido PTYG (composição por litro: 5 g peptona, 5 g triptona, 10 g extrato de levedura, 0,6 g MgSO₄.7H₂O e 0,07 g CaCl₂) adicionado de glicerol (20 %, v/v) e estocada a -80 °C. As cepas UFPEDA 614 e PAO1 foram transferidas para meios sólidos [ágar triptico de soja (TSA) e PTYG + 1,5 % (m/v) de ágar, respectivamente] antes de serem utilizadas para o preparo do inóculo (itens 4.2.1 e 4.4.1.1).

4.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.2.1. Preparo do inóculo

O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio Luria-Bertani (LB), inoculados com 1 ou 2 colônias (raspadas com alça bacteriológica) de *P. aeruginosa* UFPEDA 614 e incubados, em agitador orbital, a 30 °C por 8-12 horas sob agitação de 200 rpm (Figura 5). O crescimento bacteriano durante o preparo do inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm ($D.O_{.600}$), e o cultivo utilizado como inóculo quando a $D.O_{.600}$ encontrava-se entre 0,6 e 0,8.

4.2.2. Preparo dos cultivos para Fermentação em Estado Sólido

Os ensaios para fermentação em estado sólido (FES) foram realizados em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo 10 g de substrato sólido seco (Tabela 5). Os substratos sólidos utilizados foram: bagaço de cana-de-açúcar [lavado por três vezes com água e seco em estufa a 60 °C por 24 h ou utilizado, diretamente, sem lavar (Usina de Álcool Melhoramentos, Jussara, Paraná)]; torta de milho (Caramuru Alimentos, Unidade Apucarana, Apucarana, Paraná); farelo de girassol (obtido através da moagem de sementes de girassol adquiridas em mercado local, seguido de tamisação para obtenção de partículas de dimensão igual ou inferior a 1,7 mm); palha de arroz (Arroz Frias, Apucarana Paraná) e *okara* [(resíduo sólido da produção do extrato de soja) seco em estufa a 60 °C por 24 h, moído e armazenado na forma de “farinha” (Cocamar Cooperativa Agroindustrial de Maringá, Maringá, Paraná)]. Adicionalmente, foram utilizados misturas de substratos sólidos, na proporção de 50 % (m/m) de cada substrato sólido (Tabela 5). Para as misturas “bagaço de cana-de-açúcar + girassol” e “bagaço de cana-de-açúcar + torta de milho”, também foram utilizados proporções de misturas diferentes de 50 % (item 4.2.5 e Tabela 6).

Os substratos foram esterilizados por 15 min, a 121°C, resfriados e inoculados em uma proporção de 4 % de volume de inóculo (D.O.₆₀₀ entre 0,6 e 0,8) (item 4.2.1) em volume de solução umedecedora. Conforme as condições do ensaio estabelecidas, a solução umedecedora era constituída de meio de sais (contendo, por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O e 1,0 g (NH₄)₂SO₄) adicionada de fonte de carbono. Também foram utilizadas como solução umedecedora, solução tampão (contendo, por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄) ou

TABELA 5 - SUBSTRATOS SÓLIDOS E CONSÓRCIOS DE SUBSTRATOS SÓLIDOS UTILIZADOS NAS FES

Substratos Sólidos	Volume de meio por massa de S.S. ^a (mL/g)	Umidade (% _m /m) ^b
Bagaço de cana-de-açúcar	5,0	85
Farelo de girassol	2,5	73
Torta de milho	2,0	68
Palha de arroz	1,5	60
<i>Okara</i>	1,2	88
Bagaço de cana-de-açúcar + Farelo de girassol ^c	3,8	78
Bagaço de cana-de-açúcar + Torta de milho ^c	3,5	77
Bagaço de cana-de-açúcar + <i>Okara</i> ^c	3,1	87
Palha de arroz + Farelo de girassol ^c	2,0	77
Palha de arroz + Torta de milho	1,8	64

^a S.S. substrato sólido seco

^b Massa do meio em relação a massa do substrato sólido umedecido

^c 50% em massa de cada substrato

água, adicionadas de fonte de carbono. A solução umedecedora foi adicionada aos substratos sólido em volume suficiente para se atingir a máxima capacidade absorviva (Tabela 5, item 4.5.7.). Como fontes de carbono foram utilizados: 1) glicerol; 2) óleos vegetais (soja, milho e girassol); e 3) misturas de glicerol e óleo vegetal. Os meios sólidos inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 30°C (Figura 5).

4.2.3. Extração dos ramnolipídeos

Os cultivos foram interrompidos, no tempo de fermentação oportuno, e submetidos à extração dos ramnolipídeos com água destilada em agitador orbital a 200 rpm, por uma hora e em temperatura ambiente. Na seqüência, a mistura foi filtrada em gaze e prensada manualmente. Os extratos resultantes foram centrifugados a 12.500xg a 25 °C por 10 min e os sobrenadantes obtidos utilizados para determinação da tensão superficial (item 4.5.2) ou submetidos à extração com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (3:1) (extrato orgânico bruto) e posterior quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.5.5) (Figura 5).

4.2.4. Otimização da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em Fermentação em Estado Sólido

O processo de otimização de produção de ramnolipídeos baseou-se, essencialmente, no estudo de variações da composição dos meios de cultivo como: variações na composição do meio salino; uso de diferentes fontes de carbono; associações de fontes de carbono; uso de diferentes substratos sólidos; e uso de mistura de substratos sólidos. A estratégia de otimização utilizada alternou etapas de triagem e escolha de variáveis com etapas de otimização por metodologia de superfície de resposta.

4.2.5. Otimização da produção de ramnolipídeos por metodologia de superfície de resposta

Foram feitos dois delineamentos fatoriais. O primeiro delineamento utilizado foi um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²) incluindo 4 ensaios nas condições axiais e quatro pontos centrais, totalizando 12 ensaios (Tabela 6). As

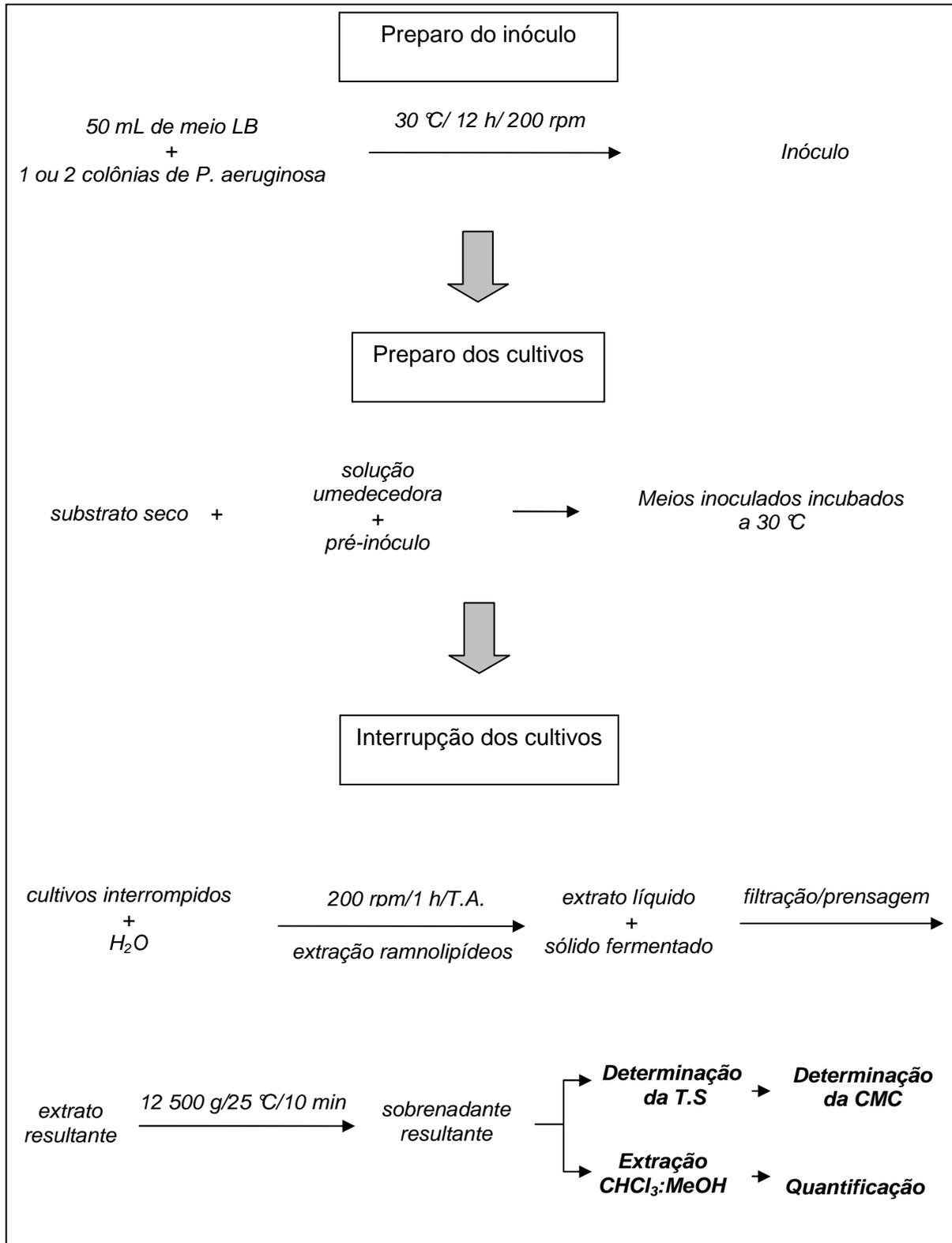


FIGURA 5 - PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Abreviaturas: T.A. temperatura ambiente, T.S. tensão superficial, CMC concentração micelar crítica

TABELA 6 – VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO DELINEAMENTO FATORIAL (DCCR 2²)

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Originais	
	X ₁	X ₂	Glicerol ^a	Bagaço/Girassol ^b
1	-1	-1	5	14,5/85,5
2	+1	-1	15	14,5/85,5
3	-1	+1	5	85,5/14,5
4	+1	+1	15	85,5/14,5
5	-1,41	0	3	50/50
6	+1,41	0	17	50/50
7	0	-1,41	10	0/100
8	0	+1,41	10	100/0
9	0	0	10	50/50
10	0	0	10	50/50
11	0	0	10	50/50
12	0	0	10	50/50

^a Porcentagem em massa seca de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol

^b Concentração de glicerol (g/L) na solução umedecedora

variáveis estudadas neste delineamento foram: 1) a concentração de glicerol e 2) a proporção em massa/massa da mistura de substratos sólidos (bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol). Já o segundo delineamento fatorial utilizado foi um delineamento composto central rotacional (DCCR 2³) incluindo 6 ensaios nas condições axiais e quatro pontos centrais, totalizando 18 ensaios (Tabela 7). Os ensaios para os dois delineamentos foram feitos em duplicata. As análises de regressão, de variância e de significância estatística, assim como a construção das superfícies de resposta, para ambos os delineamentos fatoriais, foram feitas com o software Statistica versão 6.0.

TABELA 7 – VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO DELINEAMENTO FATORIAL (DCCR 2³)

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X ₁	X ₂	X ₃	Milho/Bagaço ^a	Glicerol ^b	Óleo ^c
1	-1	-1	-1	25/75	3	3
2	+1	-1	-1	75/25	9	3
3	-1	+1	-1	25/75	3	3
4	+1	+1	-1	75/25	9	3
5	-1	-1	+1	25/75	3	9
6	+1	-1	+1	75/25	9	9
7	-1	+1	+1	25/75	3	9
8	+1	+1	+1	75/25	9	9
9	-1,68	0	0	8/92	6	6
10	+1,68	0	0	92/8	6	6
11	0	-1,68	0	50/50	1	6
12	0	+1,68	0	50/50	11	6
13	0	0	-1,68	50/50	6	1
14	0	0	+1,68	50/50	6	11
15	0	0	0	50/50	6	6
16	0	0	0	50/50	6	6
17	0	0	0	50/50	6	6
18	0	0	0	50/50	6	6

^a Porcentagem em massa de torta de milho e bagaço de cana-de-açúcar

^b Concentração de glicerol (g/L)

^c Concentração de óleo de soja (g/L)

4.3. EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.3.1. Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em frascos Erlenmeyers

Os experimentos de curva de crescimento foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 2000 mL contendo 400 mL de meio de sais e glicerol (contendo por

litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ acrescentados de 3% (v/v) de glicerol). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121 °C, resfriados e inoculados (item 4.2.1) em uma proporção de 2 % (v/v). Os cultivos foram incubados em agitador orbital a 30°C sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (4.5.1) de alíquotas de 1,0 mL retiradas a cada 1 hora. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.3.2. Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em Biorreator de 5 L (Bioflo-III Fermentor – New Brunswick Scientific)

O ensaio no biorreator foi realizado com o meio de sais e glicerol (item 4.3.1). O meio e a cúpula do reator foram esterilizados por 15 min, a 121°C, resfriados e inoculados (item 4.2.1) em uma proporção de 2 % (v/v). A fermentação foi conduzida a uma temperatura de 30°C sob agitação de 200 rpm e aeração de 3,0 L/min. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (item 4.5.1) de alíquotas de 1,0 mL retiradas a cada 1 hora.

4.3.3. Produção de ramnolipídeos por Fermentação Submersa

Os ensaios para fermentação submersa foram realizados em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo 50 mL de meio de sais e glicerol (item 4.3.1). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121 °C, resfriados e inoculados (item 5.2.1) em uma proporção de 2 % (v/v). Os cultivos foram interrompidos, no tempo de fermentação oportuno, centrifugados a 12.500xg a 25°C por 10 min e o sobrenadante obtido utilizado para determinação da tensão superficial (item 4.5.2) ou submetido à quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.5.5).

4.4. ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.4.1. Estudos fermentativos iniciais para seleção de condições de cultivo para os estudos de microarranjos

4.4.1.1 Preparo do inóculo

O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio PTYG, inoculados com 1 ou 2 colônias bacterianas isoladas a partir de placas de petri [PTYG + ágar 1,5 % (m/v)] e incubados, em agitador orbital, a 37 °C por 5-7 horas sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano durante o preparo do inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (4.5.1), e o cultivo utilizado como inóculo quando a D.O.₆₀₀ encontrava-se entre 0,6 e 0,8.

4.4.1.2. Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Os experimentos de curva de crescimento foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O e 1,0 g (NH₄)₂SO₄) acrescentados de 4 % (m/v) de glicerol, ou uma das combinações a seguir: 3 % (m/v) glicerol + 1 % (m/v) caseinato de sódio, 3 % (m/v) glicerol + 1 % (m/v) caseína hidrolisada ou 3 % (m/v) glicerol + 1 % (m/v) casaminoácidos. Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121°C, resfriados e inoculados em uma proporção de 1 % de volume de inóculo (item 4.4.1.1) em volume de meio, e incubados, em agitador orbital, a 37°C sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (4.5.1) de alíquotas de 1,0 mL. Nos

experimentos que utilizaram como fonte de carbono glicerol ou glicerol + caseinato de sódio, as curvas de crescimento, também foram feitas por plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.4.1.3. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo 100 mL de meio de sais (item 4.4.1.2) adicionados de fonte de carbono ou misturas de fontes de carbono (glicerol; caseinato de sódio; óleo de soja; glicerol + caseinato de soja; glicerol + caseína hidrolisada; glicerol + casaminoácidos; glicerol + óleo de soja; e glicerol + óleo de soja + caseinato de sódio). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121 °C, resfriados e inoculados em uma proporção de 1 % volume de inóculo (item 4.4.1.1) em volume de meio. Os cultivos foram interrompidos, no tempo de fermentação oportuno, centrifugados a 12.500×g a 25 °C por 10 min, e o sobrenadante obtido submetido à quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.5.5).

4.4.2. Coletas de amostras para obtenção de RNA

Amostras dos cultivos de PAO1 foram coletadas em diferentes fases de crescimento do microrganismo (entre 4,5 h e 48 h de cultivo). Às alíquotas coletadas adicionou-se, imediatamente, reagente protetor de RNA [RNA-protector® (Qiagen)] na proporção de 2:1 (reagente:amostra) e a mistura resultante foi armazenada a -80 °C. Adicionalmente, foram coletadas amostras para a determinação da concentração celular por contagem de unidades formadoras de colônia.

4.4.3. Etapa de lise celular

As amostras (item 4.4.2) foram descongeladas em bloco aquecido a 37 °C e centrifugadas a 5000×g por 5 min. O equivalente a 1×10^9 células de *P. aeruginosa* foi re-suspendido em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo 400 µg/mL de lisozima. As reações foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e homogeneizadas, com o auxílio de um vortex, por 10 s a cada 2 min.

4.4.4. Extração do RNA

O RNA bacteriano total foi extraído através de eluição em mini-colunas do *kit* RNeasy® Mini (Qiagen). Para isto, foram adicionados 350 µL de tampão RLT (do *kit*) adicionado de β-mercaptoetanol (10 µL β-ME /mL de RLT) aos 100 µL resultantes da reação de lise celular (item 4.4.3). Para precipitar o RNA, foram adicionados 250 µL de etanol anidro gelado. A amostra (700 µL) foi prontamente transferida para uma mini-coluna previamente posicionada sobre um tubo de coleta (do *kit*). O sistema foi centrifugado a 9000×g por 15 s, e o eluato foi descartado. Foram adicionados à mini-coluna 500 µL de tampão RPE [(do *kit*) para lavar a membrana da mini-coluna]. O sistema foi centrifugado a 9000×g por 15 s, e o eluato foi descartado. Este passo de adição de tampão RPE e centrifugação (2 min) foi repetido. A mini-coluna foi posicionada sobre um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 30-60 µL de DEPC-H₂O livre de RNase ao centro da membrana da mini-coluna, e o sistema foi centrifugado a 9000×g por 1 min, para eluir o RNA.

4.4.4. Tratamento do RNA total com DNase

O RNA total purificado foi tratado com DNaseI, segundo protocolo do fabricante com pequenas alterações (Qiagen off-column DNase treatment). A 15 µL de RNA, foram adicionados 2 µL de tampão de DNaseI [Tris-HCl (500 mM), MgCl₂.6H₂O (50 mM), Ditioneitol (10 mM)], 2,5 µL de inibidor de RNase [(10 U) Invitrogen] e 1 µL de DNase livre de RNase [(1U) Invitrogen]. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 min e interrompidas com a adição de 2 µL de EDTA (140 mM, pH 8,0 em DPEC-H₂O) seguido de incubação por 5 min a 65 °C. O RNA total contido na solução resultante foi quantificado por Fluorimetria (item 4.5.10) e sua qualidade, assim como a ausência de DNA, foi checada em eletroforese em gel de agarose (item 4.5.11). Adicionalmente, a contaminação do RNA com DNA genômico foi checada por reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para o gene *rhlB* (ramnosiltransferase 1) e subsequente eletroforese em gel de agarose (item 4.5.11).

4.4.5. Concentração do RNA total

As amostras de RNA, já livres de DNA genômico (item 4.4.4), foram concentradas por precipitação do RNA com etanol. Aos microtubos de 1,5 mL, contendo 200 µL RNA, foram adicionados 50 µL de NH₄OAc (10 M) e 500 µL de etanol anidro gelado. A mistura foi acondicionada a -20 °C por 2 h e centrifugada a 8750 × *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e 500 µL de etanol 70 % foram adicionados. A mistura resultante foi centrifugada a 8750 × *g* por 5 min a 4 °C e o sobrenadante removido cuidadosamente através do uso de uma micropipeta. Para a evaporação do etanol 70 % residual, o microtubo contendo o pellet de RNA foi acondicionado, aberto, em banho de gelo dentro da câmara de fluxo laminar por um período de 90 a 120 min. Os pellets de RNA foram então armazenados a -80 °C e submetidos ao Genomics Shared Service (Arizona Cancer Center, University of

Arizona, Tucson-AZ) onde os processamentos do GeneChip *P. aeruginosa* genome array foram feitos.

4.4.6. Processamento do *GeneChip genome array*

As etapas de síntese de cDNA, fragmentação, marcação da sonda e hibridização foram feitas segundo os protocolos do fabricante (Affymetrix) no Genomics Shared Service (Arizona Cancer Center, University of Arizona, Tucson-AZ). Adicionalmente, outra etapa de avaliação da quantidade e qualidade do RNA foi feita no Genomics Shared Service antes do processamento do GeneChip genome array. O RNA foi quantificado e qualificado, respectivamente, medindo-se sua absorbância a 230, 260 e 280 nm, em um espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) e analisado por eletroforese capilar, utilizando o sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies).

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Determinação do crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano na fermentação submersa foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm, assim como por plaqueamento em meio sólido [ágar tríptico de soja (TSA)] e contagem das unidades formadoras de colônias.

4.5.2. Determinação da tensão superficial

A medida da tensão superficial foi realizada nos sobrenadantes de cultura da fermentação submersa ou nos extratos da FES livres de células, utilizando-se um tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12 (Hamburgo, Alemanha). As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de Du Nouy. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. A força adicional exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido se rompe dá a medida da tensão superficial (KRÜSS, 1994). As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises, medindo-se a tensão superficial da água destilada.

4.5.3. Determinação da Concentração Micelar Crítica

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração de surfactante necessária para se iniciar a formação de micelas em solução; quando, após esta concentração, a concentração de surfactante continuar aumentando, não ocorrerá mais redução da tensão superficial (COOPER, 1986). A determinação da CMC foi realizada medindo-se a tensão superficial através de diluições sucessivas (com água destilada) de solução aquosa de ramnolipídeos, segundo técnica descrita por SHEPPARD e MULLIGAN (1987). Foi então construído um gráfico, plotando-se a tensão superficial medida contra a concentração de ramnolipídeos, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. As medidas de tensão superficial foram determinadas até que os valores obtidos se aproximassem da tensão superficial da água destilada (70-72 mN/m).

4.5.4. Medida do Índice de Emulsificação (E)

O índice de emulsificação (E) foi determinado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio com tampa de rosca, foram distribuídos 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, tolueno, gasolina e diesel), posteriormente, adicionou-se 4 mL de solução aquosa de ramnolipídeos. Cada tubo foi então submetido à agitação em vortex (rotação máxima) por 2 min. O índice (E) foi determinado de acordo com a equação (1). As medidas foram realizadas após 24 h e 720 h.

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

4.5.5. Quantificação dos ramnolipídeos

A quantificação dos ramnolipídeos foi realizada por determinação dos ramnolipídeos que, por sua vez, foi feita pela medida dos açúcares redutores totais (fenol-sulfúrico) pelo método de Dubois *et al.*, (1956). As curvas padrão para o método foram feitas com padrão ramnose (Sigma-Aldrich) ou padrão de ramnolipídeos (gentilmente cedido pelo Departamento de Química da Universidade do Arizona, Tucson-AZ, EUA). As quantificações foram feitas a partir de: (i) soluções aquosas de ramnolipídeos obtidas pela adição de H₂O aos extratos orgânicos de FES; ou (ii) sobrenadantes de cultivo, livre de células, provenientes de fermentação submersa. Para ambos processos fermentativos, foram feitos controles para se descontar a influência dos meios inoculados (T_0) nas reações de fenol-sulfúrico.

Os valores obtidos nas determinações dos açúcares redutores totais (ramnose) foram convertidos para ramnolipídeos utilizando-se um fator de conversão (conversão de massa de ramnose para massa de ramnolipídeos) de 3,2. Este fator

foi calculado como média dos fatores 3,0 (ITOH *et al.*, 1971) e 3,4 (BENINCASA *et al.*, 2002) relatados na literatura. É importante notar que este fator não é exato, uma vez que os ramnolipídeos são compostos por famílias de congêneres que apresentam diferentes massas moleculares (MONTEIRO *et al.*, 2007). A utilização do fator de conversão não foi necessária quando se utilizou padrão de ramnolipídeos para construção da curva padrão.

4.5.6. Medição de pH

Os valores de pH dos meios de cultivo e de soluções que necessitavam de ajuste de pH foram medidos em potenciômetro 320 pH Meter, Cornig.

4.5.7. Determinação da umidade dos substratos sólidos

Os substratos sólidos foram umedecidos com meio de cultivo, progressivamente, até que a máxima capacidade absorptiva fosse atingida. A máxima capacidade absorptiva foi determinada como o volume máximo de meio absorvido antes de haver água livre no sistema. É importante ressaltar que as adições de meio ao substrato eram seguidas por etapa de homogeneização e repouso de 45 a 90 min em copo de Becker vedado com parafilme. Uma vez determinada a máxima capacidade absorptiva, os substratos foram então umedecidos e a umidade determinada. A umidade dos substratos sólidos foi determinada em balança de infravermelho (Termobalança Top-Ray, Tecnal). Porções de substrato sólido umedecido, de massa entre 1 a 3 g, foram introduzidas no forno de infravermelho da balança e então submetidos a 120 °C por 30 min, a umidade do substrato foi então calculada como porcentagem em massa de meio contida no substrato (Tabela 5).

4.5.8. Purificação das frações mono e di-ramnolipídicas

As purificações das frações mono e di-ramnolipídicas foram feitas com o objetivo de se determinar as propriedades tensoativas e emulsificantes das frações isoladas. Os sobrenadantes obtidos no item 4.2.3 foram submetidos à extração com CHCl_3 :MeOH (3:1) e os extratos orgânicos resultantes foram recuperados em funil de decantação e então concentrados por evaporação em evaporador rotatório a 40°C. Os extratos concentrados foram submetidos à cromatografia líquida em coluna (item 4.5.9). As colunas cromatográficas foram montadas com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e eluídas com CHCl_3 :MeOH (4:1).

4.5.9. Cromatografia em camada delgada

A presença das frações ramnolipídicas eluídas foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD). As análises em CCD foram realizadas em placas de sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando como sistema eluente CHCl_3 :MeOH (4:1). As visualizações das bandas foram feitas com a utilização do revelador específico para carboidratos orcinol: H_2SO_4 :MeOH (250:100:2,5) a 100°C por 5 min (SKISPISKI, 1975), utilizando ramnose como padrão.

4.5.10. Quantificação de RNA por Fluorimetria

As amostras de RNA total, obtidas após o tratamento com DNase (item 4.4.4), foram quantificadas por fluorimetria a partir do uso de um *Kit* de quantificação de RNA RiboGreen® (Invitrogen) e um fluorômetro Turner BioSystem TBS-380. As quantificações de RNA foram feitas com base em curva padrão de RNA ribossomal de *E. coli*.

4.5.11. Eletroforese em gel de agarose

Géis contendo agarose 1,0% (para RNA) e 2,0% (para DNA) foram preparados em tampão TBE 1× (Tris 1,62%, ácido bórico 0,275%, EDTA 0,095%), conforme descrito (VOYTAS, 1992). As amostras (ou padrões) de DNA ou RNA foram diluídas em 3 µL de corante FSUDS (azul de bromofenol 0,8%, ficol 10%, xileno cianol 0,4%, SDS 1%, EDTA 1,8 mmol/L, Tris-HCl 65 mmol/L, pH 8,0), para depois serem aplicadas nos poços do gel. Efetuou-se a corrida sob 60–100 V, acompanhando a progressão do corante. Finalizada a corrida, os géis foram transferidos para cuba contendo uma solução corante de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL. Deixou-se nessa solução por cerca de 15 min. Os géis foram então lavados brevemente com água, e analisados e fotografados sob luz UV (312 nm).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CURVA DE CRESCIMENTO de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM FRASCOS ERLENMEYERS E EM BIORREATOR

Monteiro *et al.* (2007) obtiveram um processo otimizado de produção de ramnolipídeos por fermentação submersa em frascos Erlenmeyers. Com o objetivo de aumentar a escala deste processo, fez-se uma comparação entre os perfis de crescimento da *P. aeruginosa* (DO_{600}) obtidos por fermentação submersa em Erlenmeyers e em biorreator de 5 L (BioFlo-III Fermentor – New Brunswick Scientific).

Como pode ser observado na Figura 6, o crescimento da bactéria no biorreator foi muito inferior, o que pode ser explicado pela grande formação de espuma (*foaming*). O *foaming* é causado pela produção de ramnolipídeos, que se inicia no final da fase exponencial de crescimento da bactéria (DÉZIEL *et al.*, 2000), e é agravado pelo método de agitação e aeração forçada do reator (Figura 7). A grande quantidade de espuma formada reteve parte da biomassa, assim como componentes do meio. As oscilações na leitura da DO_{600} do experimento no biorreator foram causadas pela retenção da biomassa na espuma seguido da quebra parcial, ao acaso, desta espuma (Figura 6).

A formação de espuma é um grande problema da produção de biossurfactantes por fermentação submersa, pois, junto com a espuma que sai do reator, há saída e conseqüente perda de nutrientes, produtos e biomassa, reduzindo a produtividade, ou até mesmo inviabilizando a fermentação (LEE; KIM, 2004; YEH *et al.*, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010). De fato, após 20 horas de cultivo, a quantidade de espuma formada estava além da capacidade volumétrica do reator, de forma que o aumento da pressão levou à ejeção do caldo fermentado, impossibilitando a continuidade do experimento.

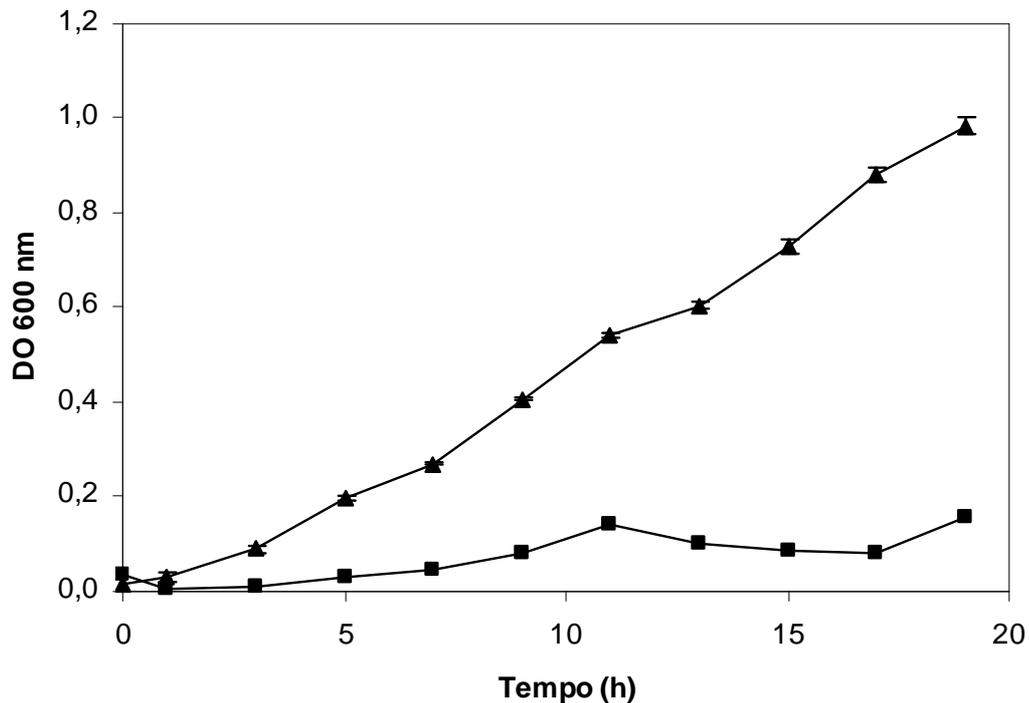


FIGURA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE CRESCIMENTO OBTIDAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614 EM ERLENMEYERS E EM BIORREATOR

Composição por litro do meio de cultivo utilizado: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% v/v de glicerol. Condições de cultivo: (▲) Erlenmeyers - experimento realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio e incubados em agitador orbital a 30°C/200 rpm (os valores plotados são referentes às médias de triplicatas \pm erro padrão); e (■) Biorreator de Fermentação Submersa (Bioflo-III Fermentor de 5,0 L) a 30°C, agitação de 200 rpm e aeração de 3,0 L/min, em 3,5 L meio de cultivo.

Duas estratégias têm sido utilizadas para combater a formação de espuma em fermentação submersa: “química” ou “mecânica”, Todavia, como relatado na revisão bibliográfica (item 2.2.3.), estas estratégias aumentam o custo de produção dos biossurfactantes e não são completamente eficientes.

Dentro deste contexto, ficou evidenciado que ampliar a escala de produção de ramnolipídeos por fermentação submersa poderia não ser a melhor forma de obter um processo viável de produção deste tensoativo. Assim, optou-se por testar a produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido (FES). A utilização desta tecnologia de cultivo na produção de ramnolipídeos estava se iniciando com

os trabalhos de dissertação de mestrado de MEIRA (2007), mas obter níveis de produção razoáveis neste sistema ainda era um desafio. Uma vez alcançados níveis de produção de ramnolipídeos por FES equiparáveis aos obtidos por fermentação submersa, a FES poderia ser uma alternativa para produção de ramnolipídeos, com potencial para ampliação de escala sem problemas com a formação de espuma.



FIGURA 7 – FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR

Fermentação submersa em biorreator (Bioflo-III Fermentor – New Brunswick Scientific) mostrando a grande formação de espuma com 11 horas de cultivo. Meio e condições de cultivo ver (Figura 6)

5.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os estudos iniciais para produção de ramnolipídeos, por fermentação em estado sólido, utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Este substrato já vinha sendo utilizado para estudos de produção de ramnolipídeos no

Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, Departamento de Química da UFPR (MEIRA, 2007).

A cinética de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* em FES pode ser vista na Figura 8. A produção do biossurfactante está expressa em gramas de ramnolipídeos por litro de meio umedecedor e também em gramas de ramnolipídeos por quilogramas de bagaço de cana-de-açúcar seco utilizado. A concentração de ramnolipídeos aumentou linearmente, alcançando 3,78 g/L (equivalente a aproximadamente 19 g/kg) em 216 h (Figura 8). Um pequeno incremento na produção pode ainda ser visto nas próximas 200 h de fermentação, e um platô de 4,5 g/L (23 kg/L) foi atingido entre 400 e 700 h de cultivo.

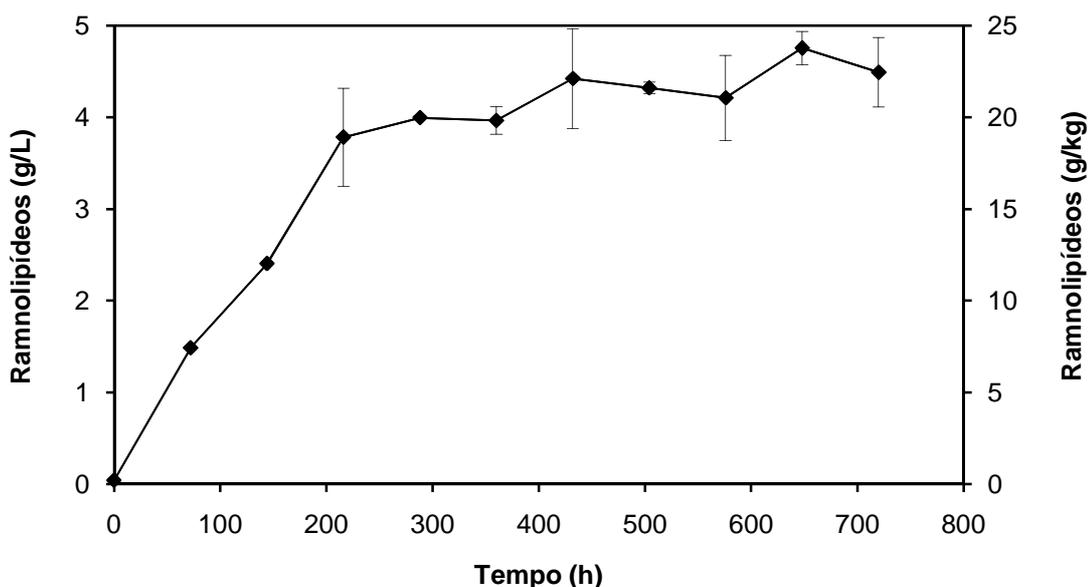


FIGURA 8 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Experimentos realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecido com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% v/v de glicerol, incubados em estufa a 30 °C. Os resultados plotados referem-se às médias das concentrações obtidas de experimentos em triplicata \pm erro padrão

5.3. ESTUDO DE SELEÇÃO DE VARIÁVEIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Neste estudo foram testadas diversas modificações nas condições padrão da FES (Figura 8) utilizadas para produção de ramnolipídeos. Todas estas modificações estão apresentadas na Tabela 8. Os cultivos nas condições padrão foram repetidos por diversas vezes e os resultados obtidos foram muito reprodutivos, com uma concentração de ramnolipídeos ao redor de 4,0 g/L (CP, Tabela 8).

5.3.1. Modificações na solução umedecedora

A solução umedecedora utilizada neste trabalho foi um meio de cultivo utilizado para a produção de ramnolipídeos por fermentação submersa pela mesma cepa de *P. aeruginosa*, descrito em MONTEIRO *et al.* (2007). Visando uma diminuição no custo do processo, foram testadas modificações neste meio, como: retirar os sais; retirar o tampão; ou utilizar somente água para umedecer o bagaço de cana-de-açúcar; assim como substituir o glicerol comercial por glicerol proveniente da produção de biodiesel (GS, GT, GA e GC, Tabela 8). Contudo, a significativa diminuição na produção de ramnolipídeos, para todas as combinações testadas, inviabilizou a retirada ou substituição de qualquer um dos componentes da solução umedecedora.

5.3.2. Efeito dos açúcares residuais presentes no bagaço de cana-de-açúcar e do aumento da concentração de glicerol na solução umedecedora

Com intuito de estudar o efeito da presença dos açúcares residuais contidos no bagaço de cana-de-açúcar foram realizadas fermentações com bagaço de cana-de-açúcar lavado. A lavagem promoveu uma redução de 23 % na concentração dos

açúcares redutores totais (ART) presentes no bagaço (antes da lavagem, o bagaço continha $8,7\pm 0,7$ gramas de ART por quilograma de bagaço de cana-de-açúcar

TABELA 8 - EFEITO NAS CONCENTRAÇÕES DE RAMNOLIPÍDEOS OBTIDAS ATRAVÉS DE MODIFICAÇÕES NAS CONDIÇÕES PADRÃO DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, EM 288 H DE FERMENTAÇÃO

Modificações na condição padrão	Código	Ramnolipídeos ^a (g/L)
Condição padrão	CP	$4,00\pm 0,18$ $3,90\pm 0,17$ $4,00\pm 0,09$
Fermentação submersa utilizando o a mesma solução de sais da FES com 3% (v/v) glicerol	FS	$12,18\pm 0,53$
Condição padrão, sem o tampão	GS	$1,02\pm 0,07$
Condição padrão, sem os sais	GT	$1,10\pm 0,04$
Condição padrão, sem os sais e sem o tampão	GA	$1,00\pm 0,03$
Condição padrão, com substituição do glicerol por glicerina loura proveniente da produção de biodiesel	GC	$1,89\pm 0,05$
Condição padrão, com o bagaço previamente lavado	BL	$2,53\pm 0,06$
Condição padrão, com o bagaço previamente lavado e utilizando 6% v/v glicerol	BLG6	$1,18\pm 0,08$
Condição padrão, substituição do glicerol por óleo de soja	OS	$1,63\pm 0,08$
Condição padrão, substituição do glicerol por óleo de milho	OM	$1,86\pm 0,05$
Condição padrão, substituição do glicerol por óleo de girassol	OG	$1,73\pm 0,10$
Condição padrão, utilizando 6% v/v glicerol	G6	$4,06\pm 0,20$
Condição padrão, com adição de mais glicerol (3% v/v) após 144 h de fermentação	G3G3	$0,48\pm 0,06$
Condição padrão, o microrganismo foi cultivado por 24 h na solução umedecedora antes de ser misturado com o sólido	FP	$7,04\pm 0,06$
Bagaço de cana-de-açúcar+Farelo de girassol ^b 3% (v/v) glicerol	BFG3	$6,18\pm 0,12$
Bagaço de cana-de-açúcar+Farelo de girassol ^b 6% (v/v) glicerol	BFG6	$17,92\pm 0,81$

^a As concentrações de ramnolipídeos são referentes as valores a media das concentrações obtidas a partir de triplicatas \pm erro padrão

^b Bagaço de cana-de-açúcar e Farelo de girassol, 50% em massa de cada substrato

seco, e após a lavagem, $6,3 \pm 0,6$ gramas de ART). Assim, o bagaço submetido ou não ao procedimento de lavagem foi utilizado como substrato para fermentação. O bagaço foi umedecido com solução de sais e glicerol e a concentração de glicerol utilizada foi de 3 % (v/v), como nas condições pré-estabelecidas na Figura 8. Adicionalmente, foi testada a utilização de 6 % (v/v) de glicerol, tanto para o bagaço lavado como para o não lavado. O procedimento de lavagem causou uma diminuição na produção de ramnolipídeos (BL, Tabela 8). O incremento na concentração de glicerol, utilizado para suprir o déficit de fonte de carbono ocasionado pela lavagem, causou uma queda ainda maior na produção de ramnolipídeos (BLG6, Tabela 8). Este resultado provavelmente esteja mais relacionado com as características físicas do bagaço (o bagaço lavado e com uma maior adição de glicerol ficou visualmente mais compactado, o que provavelmente tenha dificultado as trocas gasosas), do que com a disponibilidade de fonte de carbono.

Por outro lado, a menor produção de ramnolipídeos no cultivo com bagaço lavado é um forte indício de que, na condição padrão (tratamento CP), o microrganismo esteja utilizando os açúcares residuais do bagaço de cana-de-açúcar. Nenhum incremento significativo na produção de ramnolipídeos foi encontrado nos experimentos com a adição de mais glicerol ao bagaço não lavado. Pode-se dizer que, nas condições do processo fermentativo utilizadas, seria difícil aumentar o nível de ramnolipídeos produzido utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como substrato e utilizando somente o glicerol como fonte de carbono.

5.3.3. Utilização de óleos vegetais como fonte de carbono e indutor

Os melhores resultados de produções de ramnolipídeos em fermentação submersa, reportados na literatura, foram obtidos utilizando óleos vegetais ou resíduos ricos em óleos como fonte de carbono e indutor (LINHARDT *et al.*, 1987; LANG; WULLBRANDT, 1999; NITSCHKE *et al.*, 2005b; COSTA *et al.*, 2006; BENINCASA *et al.*, 2002, BENINCASA; ACCORSINI, 2008). Assim, experimentos

utilizando óleos vegetais (soja, milho e girassol) como fontes de carbono foram realizados. A utilização destes óleos causou uma queda significativa na produção de ramnolipídeos comparada ao controle, que utilizava como fonte de carbono o glicerol (OS, OM, OG, Tabela 8). A menor produção obtida com a utilização dos óleos provavelmente esteja ligada à dificuldade de aeração do meio, uma vez que uma camada de óleo recobria o substrato, dificultando as trocas gasosas. A utilização do glicerol como fonte de carbono foi mantida para os posteriores experimentos, uma vez que este composto é um indutor da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* (JARVIS; JOHNSON, 1949). Outra vantagem de se usar o glicerol é a disponibilidade desse composto, já que é um subproduto da produção do biodiesel (SALUM *et al.*, 2009).

5.3.4. Estudo de outras variáveis do processo fermentativo.

Neste ponto do trabalho, optou-se por testar outras variáveis do processo, como: batelada alimentada; crescimento prévio do microrganismo, por 24 horas, no meio umedecedor por fermentação submersa; utilização de uma mistura de substratos sólidos [bagaço de cana e farelo de girassol (fonte de óleo)]; além da fermentação submersa com o meio umedecedor.

A produção de ramnolipídeos aumentou de 4,0 para 7,0 g/L (78 %) (CP, FP, Tabela 8) quando o microrganismo foi crescido previamente em fermentação submersa por 24 horas. Este resultado pode estar relacionado a uma possível dificuldade de crescimento do microrganismo no substrato sólido (relacionada principalmente à limitação de água, ao acesso aos nutrientes e a aeração do sistema) que, neste caso, estaria sendo suprida pelo crescimento prévio em fermentação submersa. A escolha do tempo de fermentação de 24 horas foi baseada em estudos de cinética de crescimento bacteriano, que mostraram que os cultivos com 24 horas já estavam muito próximo do fim da fase exponencial de crescimento.

Um incremento de 56 % na produção de ramnolipídeos foi alcançado com a utilização da mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol (6,18 g/L) em relação à utilização do bagaço puro (4,0 g/L) (CP, BFG3, Tabela 8). Uma vez que a massa de óleo presente na semente de girassol é de aproximadamente 40 % (m/m) e que as maiores taxas de produção de ramnolipídeos, na literatura, foram obtidas com o uso de óleos ou resíduos ricos em óleos como fonte de carbono e indutor (LINHARDT *et al.*, 1987; LANG; WULLBRANDT, 1999; NITSCHKE *et al.*, 2005b; COSTA *et al.*, 2006; BENINCASA *et al.*, 2002; BENINCASA; ACCORSINI, 2008), provavelmente o óleo do farelo de girassol esteja servindo como indutor para produção dos ramnolipídeos. Adicionalmente, pode-se inferir que a mistura dos substratos apresente características físicas favoráveis para o crescimento da bactéria e produção dos ramnolipídeos: melhor aeração, melhor transferência de massa e calor, e menor empacotamento.

Uma vez que o aumento da concentração de glicerol na solução umedecedora não havia proporcionado melhora nas taxas de produção de ramnolipídeos (item 6.4.2 e Tabela 8) optou-se por testar uma adição de glicerol após 144 horas de fermentação. Assim a solução umedecedora inicial continha 3 % (v/v) de glicerol e a alimentação foi feita com mais 3 % (v/v) de glicerol (G3G3, Tabela 8). No entanto, a produção de ramnolipídeos foi fortemente diminuída. O distúrbio causado pela homogeneização do glicerol adicionado, feita com um bastão de vidro, pode ter sido a causa da queda de produção, uma vez que o crescimento da bactéria no substrato, provavelmente, seja na forma de biofilme. Desta forma, o procedimento de homogeneização deve ter rompido a estrutura do biofilme e conseqüentemente desfavorecido a produção dos ramnolipídeos. Uma maior compactação do bagaço, ocasionada por este procedimento, pode também ter influenciado negativamente a produção de ramnolipídeos.

Apesar dos incrementos obtidos, tanto com a utilização da mistura de substratos (BFG3) como com o crescimento prévio do inóculo por fermentação submersa (FP) (6,18 e 7,04 g/L, respectivamente, Tabela 8), neste ponto do trabalho, a FES ainda apresentava resultados de produção inferiores aos apresentados pela fermentação submersa (12,18 g/L, Tabela 8). Mesmo

considerando a vantagem que a FES apresenta de se evitar a formação de espuma, obter uma produção equivalente ou mesmo superior àquela da fermentação submersa seria indispensável para se mostrar a viabilidade da produção de ramnolipídeos por FES. Neste contexto, um aumento da concentração de glicerol (6% v/v) com a utilização da mistura de bagaço e girassol também foi testado (BFG6, Tabela 8). Diferente do resultado obtido com o bagaço puro, um incremento de quase 3 vezes na produção de ramnolipídeos foi obtido em relação ao bagaço com girassol e 3 % (v/v) de glicerol, e um aumento de mais de 4,5 vezes em relação ao controle [bagaço puro com 3 % (v/v) de glicerol] (BFG3 e CP, Tabela 8). Este incremento pode estar relacionado com a melhora das características físicas da mistura (como explicado acima) propiciando melhor condição para crescimento do microrganismo, consumo de glicerol e produção de ramnolipídeos. Contudo, o que se destaca é exatamente a correlação positiva entre o glicerol e o farelo de girassol. Em outras palavras, na presença de farelo de girassol foi possível adicionar mais glicerol ao sistema e conseqüentemente se obter uma maior produção de ramnolipídeos.

A utilização da mistura de farelo de girassol com o bagaço de cana apresenta varias vantagens: (1) a disposição do óleo na semente triturada não trás problemas como dificuldade com as trocas gasosas; (2) a mistura apresenta um menor empacotamento do que estes substratos puros, fornecendo melhores condições de crescimento e produção de ramnolipídeos; e (3) o farelo de girassol é uma fonte de óleo de menor custo do que óleo refinado.

A produção de ramnolipídeos (em base de solução umedecedora adicionada) obtida com a mistura de substratos e aumento da concentração de glicerol foi superior a obtida por fermentação submersa (BFG6, Tabela 8). Adicionalmente, pode-se dizer que o uso da mistura de substrato mostrou-se como uma alternativa para a utilização dos óleos como indutor da produção de ramnolipídeos por FES. Estes resultados indicaram a viabilidade da utilização da mistura de substratos e da FES como um todo para a produção de ramnolipídeos.

5.3.5. Influência do crescimento prévio do microrganismo em fermentação submersa e da concentração de glicerol em FES utilizando bagaço de cana e farelo de girassol como substratos

Este estudo foi feito a partir dos dois resultados positivos obtidos nos experimentos anteriores (com crescimento prévio da bactéria em fermentação submersa por 24 horas e com a utilização da mistura de substratos). Também foram testadas concentrações ainda maiores de glicerol. O melhor resultado de produção, de aproximadamente 40 g/L de ramnolipídeos, foi obtido com 10 % (v/v) de glicerol (Tabela 9), sendo mais de duas vezes maior do que o melhor resultado obtido na Tabela 8.

TABELA 9 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FARELO DE GIRASSOL AO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, ADIÇÃO DE MAIS GLICEROL E DO INÓCULO PRÉ-CULTIVADO NA SOLUÇÃO UMEDECEDORA NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

Substrato Sólido e fonte de carbono	Ramnolipídeos (g/L) em 288 h de fermentação	
	Inóculo Padrão	Inóculo pré-cultivado por 24 h na solução umedecedora
Girassol, 3 % (v/v) glicerol	11,1±1,4	14,0±0,5
Bagaço+Girassol ^a , 3 % (v/v) glicerol	11,5±1,2	14,5±0,2 ^b
Bagaço+Girassol ^a , 6 % (v/v) glicerol	26,1±1,5	28,1±0,7 ^b
Bagaço+Girassol ^a , 10 % (v/v) glicerol	39,8±1,4	38,3±1,2

^a Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol, 50% em massa de cada.

^b Os resultados apresentados aqui são superiores aos apresentados para as mesmas condições reportadas na Tabela 8, pois aqui o número de extrações com solvente orgânico foi aumentado de três para cinco vezes. Este procedimento foi adotado pois, com o aumento das concentrações de ramnolipídeos obtidos com as novas condições, o número de extrações passaram a não ser mais suficientes

O crescimento prévio da bactéria por fermentação submersa (Tabela 9) só foi significativo na concentração de 3 % (v/v) de glicerol para a mistura de substratos e

para o farelo de girassol puro. Adicionalmente, pode ser observado que os resultados de produção apresentados na Tabela 8, para a mistura de substratos sólidos com 3 e 6 % (v/v) de glicerol, são inferiores aos resultados obtidos com experimentos, nas mesmas condições, mostrados na Tabela 9. Este fato se deve a pequenas modificações na metodologia de extração (aumento no número de extrações, ver Tabela 9), que se fizeram necessárias, haja vista o grande aumento nas taxas de produção (Tabela 8, Tabela 9).

O farelo de girassol puro apresentou uma produção um pouco superior ao da mistura de substratos para a mesma concentração de glicerol (3 %, v/v). No entanto, neste ponto do trabalho, não foi testado o farelo de girassol puro com maior concentração de glicerol. O farelo puro é mais caro do que o bagaço de cana e também apresenta uma menor capacidade de absorção do meio umedecedor e conseqüentemente um menor rendimento por massa seca de substrato utilizado. Adicionalmente, o farelo de girassol puro apresenta um maior empacotamento, o que provavelmente inviabilize a utilização deste em um biorreator de FES.

5.4. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Dado as grandes mudanças nas condições de cultivo, assim como o grande incremento nas taxas de produção, um novo estudo cinético de produção de ramnolipídeos foi feito (Figura 9). Neste experimento, utilizou-se solução de sais com 10 % (v/v) de glicerol e a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e girassol na proporção de 50 % em massa de cada. O perfil de produção apresentou-se muito semelhante ao obtido com apenas o bagaço de cana-de-açúcar como substrato (Figura 8), mas com taxas de produção bem superiores, por volta de 45 g/L após 200 horas de fermentação (Figura 9). Neste experimento, utilizou-se a fração inteira de farelo de girassol que passa pelo tamis de 10-mesh, enquanto nos experimentos prévios tinha sido utilizada a fração retida entre os tamises de 10 e 20-mesh. Esta mudança aumentou um pouco a produção do biossurfactante produzido em relação ao resultado apresentado na Tabela 9, que era por volta de 40 g/L. Possivelmente, a

fração de menor diâmetro de farelo de girassol, previamente rejeitada, continha nutrientes e indutores importantes para produção dos ramnolipídeos.

5.5. DELINEAMENTO FATORIAL DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE GIRASSOL COMO SUBSTRATO SÓLIDO

Os resultados da Tabela 9 indicaram que a adição de farelo de girassol ao sistema e a concentração de glicerol foram os fatores que mais influenciaram a produção de ramnolipídeos. Desta forma, optou-se por utilizar a metodologia de superfície de resposta para checar a influência destes dois fatores na produção de ramnolipídeos por FES. Com este propósito, utilizou-se um delineamento composto

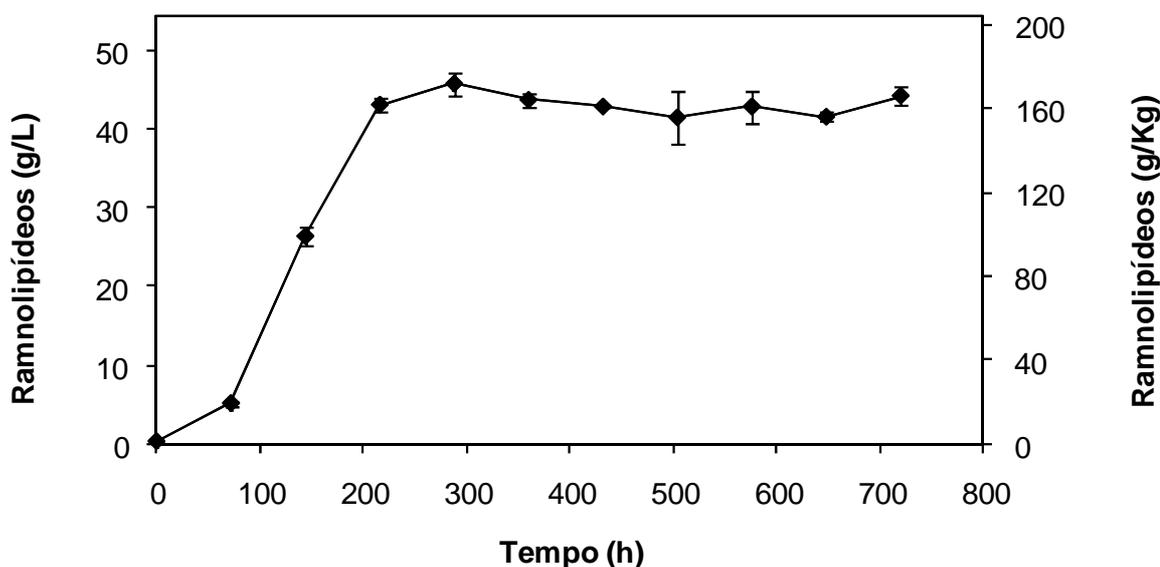


FIGURA 9 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Experimentos realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 5 g de bagaço de cana-de-açúcar + 5 g de farelo de girassol umedecidos com 38 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10% v/v de glicerol, incubados em estufa a 30 °C. Os resultados plotados referem-se às médias das concentrações obtidas de experimentos em triplicata \pm erro padrão

central rotacional (fatorial completo 2^2), incluindo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais, centrados na melhor condição obtida na Tabela 9 [bagaço de cana-de-açúcar+farelo de girassol (50 % em massa de cada), 10 % (v/v) de glicerol]. As variáveis independentes foram: a concentração de glicerol na solução umedecedora (% v/v), representada pela variável codificada X_1 e a proporção em massa de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol (% contribuição por massa), representada pela variável codificada (X_2). A Tabela 10 apresenta os valores das variáveis independentes codificadas e originais. A Tabela 11 apresenta o delineamento fatorial com as variáveis independentes e a variável resposta: experimental (Y , concentração de ramnolipídeos em 288 h de fermentação); e predita pela equação ajustada (\hat{Y}). A equação ajustada é dada por:

$$\hat{Y} = 46,25 - 2,35X_1 - 6,18X_2 - 15,80X_1^2 - 14,92X_2^2 - 9,74X_1X_2 \quad (2)$$

O valor do coeficiente de determinação (R^2) para produção de ramnolipídeos foi de 0,97, indicando que 97 % do total das variações nos níveis de produção dos ramnolipídeos podem ser atribuídas às variáveis independentes e apenas 3 % não pode ser explicado pelo modelo. Em outras palavras, a equação se ajustou bem aos dados experimentais. A análise de variância mostrou que os termos lineares, quadráticos e de interação foram significativos ($p < 0,05$), exceto para o termo linear da concentração de glicerol. O fato do termo de interação ser significativo não foi

TABELA 10 - VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTS USADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL

Níveis	Variáveis Originais	
	Concentração de Glicerol (% v/v)	Bagaço/Girassol (% em massa)
-1,41	3	0:100
-1	5	14,5:85,5
0	10	50:50
+1	15	85,5:14,5
+1,41	17	100:0

surpreendente, uma vez que experimentos prévios mostraram que o aumento da concentração de glicerol apresentou um forte efeito quando o farelo de girassol foi adicionado ao sistema. O modelo mostrou-se muito significativo, com um p -valor extremamente baixo e um F -calculado mais de 8 vezes superior ao F -tabelado (Tabela 12), sendo assim possível se construir a superfície de resposta (Figura 10). A superfície de resposta mostrou que o ponto central, obtido previamente passo a passo, era realmente o da região de ótima produção de ramnolipídeos.

TABELA 11 - DELINEAMENTO FATORIAL COM AS CONCENTRAÇÕES DE RAMNOLIPÍDEOS OBSERVADAS E PREDITAS

Ensaio	Variáveis Independentes		Concentração de ramnolipídeos (g/L)	
	Glicerol	Bagaço/Girassol	Observado (Y)	Predito (\hat{Y})
1	-1	-1	15,7	14,3
2	+1	-1	32,2	29,1
3	-1	+1	25,0	21,4
4	+1	+1	2,5	0,0
5	-1,41	0	16,0	18,2
6	+1,41	0	7,0	11,5
7	0	-1,41	23,6	25,3
8	0	+1,41	3,0	7,9
9	0	0	45,1	46,3
10	0	0	48,5	46,3
11	0	0	45,9	46,3
12	0	0	45,6	46,3

TABELA 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA 11

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Regressão	3232.72	5	646.54		
Resíduos	109.50	6	18.25	35.43	0.000001
Total	3342.22	11			

$F_{5,6,0.05} = 4,4$

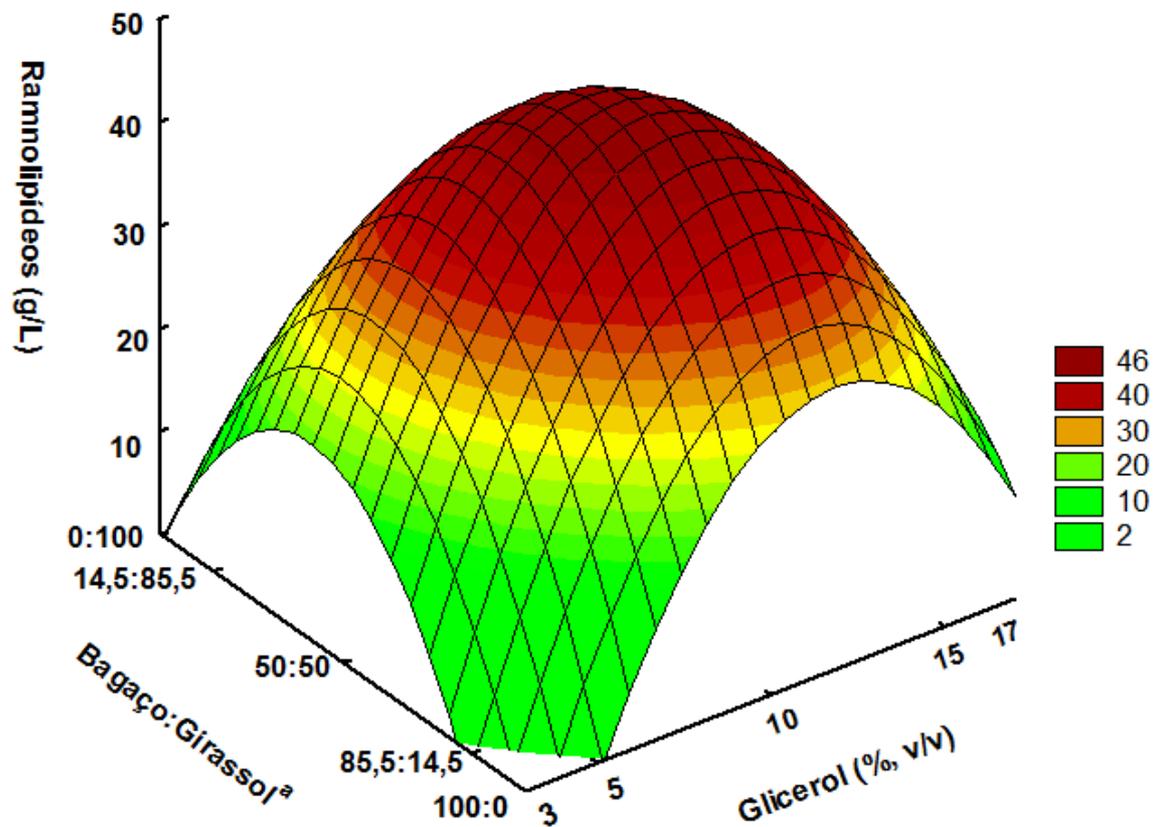


FIGURA 10 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As variáveis independentes são: a proporção relativa de bagaço de cana-de-açúcar/farelo de girassol e concentração de glicerol na solução umedecedora (neste gráfico utilizou-se os valores originais das variáveis). A variável resposta é concentração de ramnolipídeos com 288 horas de cultivo, expressa em base de volume de solução umedecedora utilizada (i.e., g/L).

5.6. A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE GIRASSOL SUPLEMENTADO COM SAIS E GLICEROL MOSTROU-SE VIÁVEL

A partir dos resultados deste trabalho, demonstrou-se que é possível produzir ramnolipídeos por fermentação em estado sólido (FES). Este trabalho proporcionou o desenvolvimento de um processo de produção, otimizado, de ramnolipídeos por FES, em escala de bancada. Os estudos de otimização proporcionaram um incremento de 10 vezes na produção inicial obtida por FES, e em torno de 4 vezes, se comparado com o obtido na fermentação submersa.

Pouco se estudou da produção de biossurfactantes por FES e não haviam estudos sobre a produção de ramnolipídeos por FES. Estudos prévios de produção de biossurfactantes por FES já foram feitos com cepas de *Bacillus*. Ohno, Ano e Shoda (1992,1993, 1995a, 1995b, 1996) relataram a produção de lipopeptídeos anti-fitopatogênicos, com propriedades antibióticas e tensoativas, produzidos por cepas de *Bacillus*. Os níveis de produção de inturina A alcançados por estes trabalhos foram da ordem de 1,65 g/kg de sólido úmido (OHNO; ANO; SHODA, 1996). Com base no conteúdo inicial de umidade de aproximadamente 80 % (m/m, em base seca), este resultado iria corresponder a aproximadamente 8 g/kg de substrato sólido seco. Já no caso da produção de surfactina, os níveis de produção alcançados foram da ordem de 3 g/kg de substrato sólido seco (OHNO; ANO; SHODA, 1995a, 1995b). Mais recentemente, Veenadig, Gowthaman e Karanth (2000) estudaram a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* cultivados em torta de trigo. No entanto, estes pesquisadores não identificaram e nem mesmo quantificaram o biossurfactante produzido. A análise dos resultados foi feita através das propriedades emulsificantes e tensoativas das amostras do substrato sólido fermentado adicionado de água. Uma vez que utilizaram apenas métodos qualitativos sem nenhuma correlação diretamente dependente da real concentração do biossurfactante, torna-se difícil fazer qualquer avaliação significativa destes resultados. Mais recentemente, Das e Mukherjee (2007) utilizaram duas cepas termofílicas de *B. subtilis* cultivadas em resíduos de casca de batata. O melhor resultado obtido por estes pesquisadores foi de 92 g/kg de sólido seco. O melhor resultado obtido por este trabalho de tese foi de 172 g/kg de bagaço de cana e farelo de girassol secos. Entretanto, uma vez que lipopeptídeos e ramnolipídeos são diferentes classes de biossurfactantes, não é possível fazer qualquer conclusão a partir desta comparação.

Este trabalho sugere que a FES apresenta potencial para ser uma alternativa viável para produção de ramnolipídeos. Em base de solução umedecedora utilizada, o melhor resultado atingido por este trabalho foi de 46 g/L. Este nível de produção é comparável aos melhores resultados de produção de ramnolipídeos obtidos por fermentações submersas publicados na literatura, 16 g/L (BENINCASA *et al.*, 2002), 23 g/L (LEE *et al.*, 2004), 32 g/L (MATSUFUJI; NAKATA; YOSHIMOTO, 1997),

45 g/L (TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK , 2003), e 46 g/L (LINHARDT *et al.*, 1989). Estes resultados de fermentações submersas foram obtidos em pequena escala, de forma que a reprodução destes resultados com similares taxas de produção, mas em reatores de maior escala, seria bastante prejudicada pela formação de espuma.

5.7. SELEÇÃO DE OUTROS SUBSTRATOS SÓLIDOS PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

Com os estudos de produção de ramnolipídeos por FES apresentados até este ponto (itens 5.2 a 5.6), obteve-se um processo de produção otimizado de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 cultivada em meio sólido composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol umedecido com solução de sais e glicerol. A partir deste ponto do trabalho, investigou-se a possibilidade de se substituir o bagaço de cana-de-açúcar por palha de arroz e o farelo de girassol por torta de milho. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos com estes substratos sozinhos ou combinados aos pares, umedecidos com solução de sais contendo 3 % (v/v) de glicerol.

Os melhores resultados foram obtidos com a mistura de palha de arroz e farelo de girassol e com a mistura de bagaço de cana-de-açúcar com torta de milho (aproximadamente 26 g/kg para ambas) (Tabela 13). Baseado no fato de que, no caso da utilização da mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol, altas taxas de produção de ramnolipídeos por FES foram obtidas aumentando-se a concentração de glicerol adicionado (item 5.3.5), testou-se o efeito do aumento da concentração de glicerol adicionado para as novas misturas. Para ambas as misturas de substratos, os maiores níveis de produção foram obtidos com solução umedecedora contendo 10 % (v/v) de glicerol (Tabela 14).

Na concentração de 10 % (v/v) de glicerol, a produção de ramnolipídeos (96,9 g/kg) obtida com a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho foi

aproximadamente de 1,6 vezes superior aos 61,8 g/kg obtidos com a mistura de palha de arroz e farelo de girassol. No entanto, a produção de ramnolipídeos em g/L

TABELA 13 – EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS SÓLIDOS NAS TAXAS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Composição do sólido	Concentração de ramnolipídeos com 288 h		Volume (mL) de solução umedecedora adicionada 10 g de substrato sólido
	(g/L)	(g/kg)	
Bagaço de cana-de-açúcar ^c	4,0±0,2	20,0±1,0	50,0
Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol ^c	11,5±1,2	43,1±4,4	37,5
Palha de arroz	5,5±0,4	8,2±0,6	15,0
Torta de milho	7,2±0,2	14,5±0,3	20,0
Bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho ^c	7,3±0,2	25,6±0,8	35,0
Palha de arroz e torta de milho ^c	8,5±1,0	14,4±1,8	17,5
Palha de arroz e farelo de girassol ^c	13,1±0,5	25,5±1,0	19,5

^a As concentrações de ramnolipídeos são referentes aos valores a média das concentrações obtidas a partir de triplicatas ± erro padrão

^b Solução umedecedora contendo 3 % (v/v) de glicerol

^c Misturas de substratos sólidos, 50% em massa de cada substrato

foi similar para as duas misturas de substrato (Tabela 14). Esta diferença deve-se ao fato da mistura de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho apresentar capacidade de absorver a solução umedecedora 1,8 vezes superior à apresentada pela mistura de palha de arroz e farelo de girassol [Tabela 13 e Tabela 5 (materiais e métodos)].

Considerando os resultados das Tabelas 13 e 14, assim como o fato da torta de milho ser mais barata e abundante que o farelo de girassol, escolheu-se a

mistura de 50:50 (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho, suplementada com solução umedecedora contendo 10 % (v/v) de glicerol, para a continuação dos estudos.

TABELA 14 - EFEITO DA ADIÇÃO DE MAIS GLICEROL À SOLUÇÃO UMEDECEDORA NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Concentração de glicerol (% v/v)	Concentração de ramnolipídeos em 288 h			
	Bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho ^b		Palha de arroz e farelo de girassol ^b	
	(g/L)	(g/kg)	(g/L)	(g/kg)
3	7,9±0,2	27,6±0,7	13,6±0,6	26,4±1,2
6	19,1±1,7	67,0±5,9	27,4±3,0	53,5±5,8
10	27,7±1,9	96,9±5,8	31,7±2,7	61,8±5,2
15	13,8±1,2	48,2±4,1	25,7±2,3	50,2±4,6

^a As concentrações de ramnolipídeos são referentes aos valores a média das concentrações obtidas a partir de triplicatas ± erro padrão

^b Solução umedecedora contendo 3 % (v/v) de glicerol

5.8. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *P. aeruginosa* UFPEDA 614 POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO COMO SUBSTRATO

A cinética de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* em FES, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho, pode ser vista na Figura 11. A produção do biossurfactante está expressa em gramas de ramnolipídeos por litro de meio umedecedor e também em gramas de ramnolipídeos por quilogramas de fermentado seco. A concentração de ramnolipídeos aumentou linearmente, alcançando 27 g/L (equivalente a 94 g/kg) em 216 h (Figura 11).

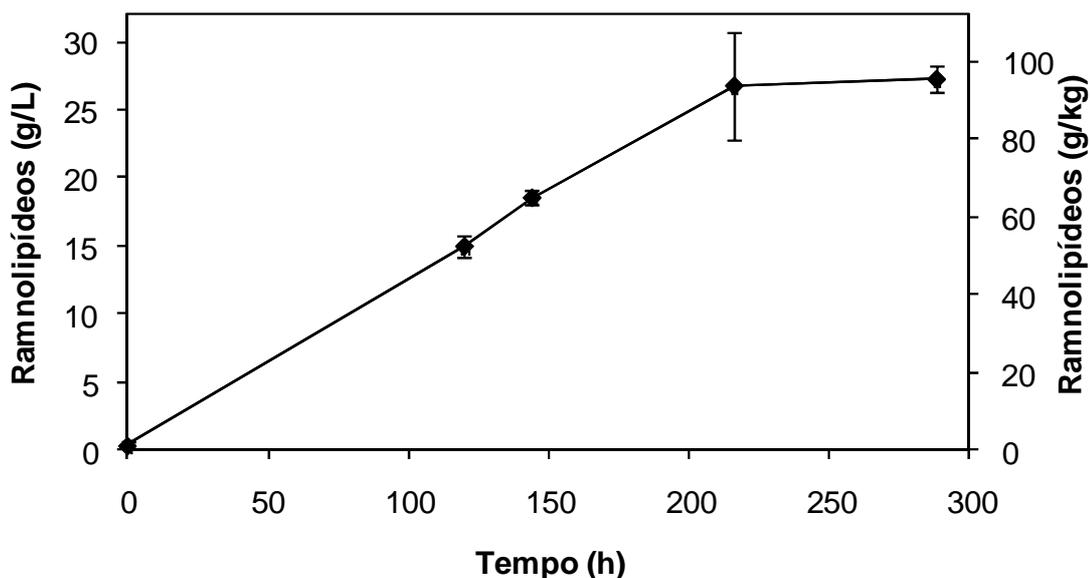


FIGURA 11 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O CONSÓRCIO DE SUBSTRATOS BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO

Experimentos realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 5 g de bagaço de cana-de-açúcar + 5 g de torta de milho umedecidos com 35 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10% v/v de glicerol, incubados em estufa a 30 °C. Os resultados plotados referem-se às médias das concentrações obtidas de experimentos em triplicata \pm erro padrão

5.9. SUPLEMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO UMEDECEDORA COM ÓLEO DE SOJA

Uma vez que os níveis máximos de produção obtidos com a nova mistura de substratos (bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho) ainda eram inferiores aos alcançados no estudo anterior (46 g/L ou 172 g/kg, itens 5.4 e 5.5) obtidos com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol, optou-se por adicionar 3 % (v/v) de óleo de soja na solução umedecedora. A adição do óleo baseou-se no fato do farelo de girassol utilizado no estudo anterior ser rico em óleo (40 % m/m) enquanto que a torta de milho não é. A adição do óleo de soja proporcionou um incremento na produção de ramnolipídeos de $27,7 \pm 1,9$ g/L para $36,0 \pm 1,5$ g/L.

5.10. DELINEAMENTO FATORIAL DA PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS POR FES UTILIZANDO A MISTURA DE SUBSTRATOS: BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO

Os resultados apresentados nas seções 5.7 e 5.9 indicaram que a utilização da mistura de substratos (bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho), o incremento na concentração de glicerol, e a adição de óleo de soja ao sistema foram os fatores que mais influenciaram a produção de ramnolípídeos. Desta forma, optou-se por utilizar a metodologia de superfície de resposta para checar a influência destes três fatores na produção de ramnolípídeos por FES. Com este propósito, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (fatorial completo 2^3), incluindo seis pontos axiais e quatro pontos centrais (Tabela 15). As variáveis independentes foram: a proporção em massa de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho (% contribuição por massa), representada pela variável codificada X_1 ; a concentração de glicerol adicionado à solução umedecedora (% v/v), representada pela variável codificada X_2 ; e a concentração de óleo de soja adicionado à solução umedecedora (% v/v), representada pela variável codificada X_3 . A Tabela 15 apresenta os valores das variáveis independentes codificadas e originais. A Tabela 16 apresenta o

TABELA 15 - VALORES ORIGINAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTS USADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL

Valores codificados	Valores originais		
	Bagasso/milho (% em massa)	Concentração de glicerol (%, v/v)	Concentração de óleo (%, v/v)
-1,68	92/8	1	1
-1	75/25	3	3
0	50/50	6	6
+1	25/75	9	9
+1,68	8/92	11	11

delineamento fatorial com as variáveis independentes e a variável resposta experimental (Y , concentração de ramnolipídeos em 288 h de fermentação) e predita pela equação ajustada (\hat{Y}). A equação ajustada é dada por:

$$\hat{Y} = 45,23 + 2,71X_1 - 1,95X_2 + 2,73X_3 - 9,24X_1^2 - 8,98X_2^2 - 2,50X_3^2 - 5,50X_1X_2 - 0,90X_1X_3 - 2,41X_2X_3 \quad (3)$$

O valor do coeficiente de determinação (R^2) para produção de ramnolipídeos foi de 0,97, indicando que 97 % do total das variações nos níveis de produção dos ramnolipídeos podem ser atribuídas às variáveis independentes e apenas 3 % não pode ser explicado pelo modelo. Em outras palavras a equação se ajustou bem aos dados experimentais.

A análise de variância mostrou que os termos lineares e quadráticos foram significativos ($p < 0,05$). Já em relação aos termos de interação, apenas a interação entre a concentração de glicerol (X_2) e a proporção em massa de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho (X_1) foi significativa ($p < 0,05$).

O modelo mostrou-se muito significativo, com um p -valor extremamente baixo e um F -calculado mais de 7 vezes superior ao F -tabelado (Tabela 17), sendo assim possível se construir a superfície de resposta, fixando um dos fatores e avaliando os outros dois (Figura 12). Os três fatores foram fixados, um de cada vez no nível codificado zero (Figura 12). As superfícies de resposta indicaram que o ponto central (proporção em massa de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho 50 % de cada, e a concentração de 6 % (v/v) adicionada à solução umedecedora tanto de glicerol como de óleo de soja) era realmente o ponto ótimo para produção de ramnolipídeos (Figura 12).

TABELA 16 - DELINEAMENTO FATORIAL COM AS CONCENTRAÇÕES DE RAMNOLIPÍDEOS OBSERVADAS E PREDITAS

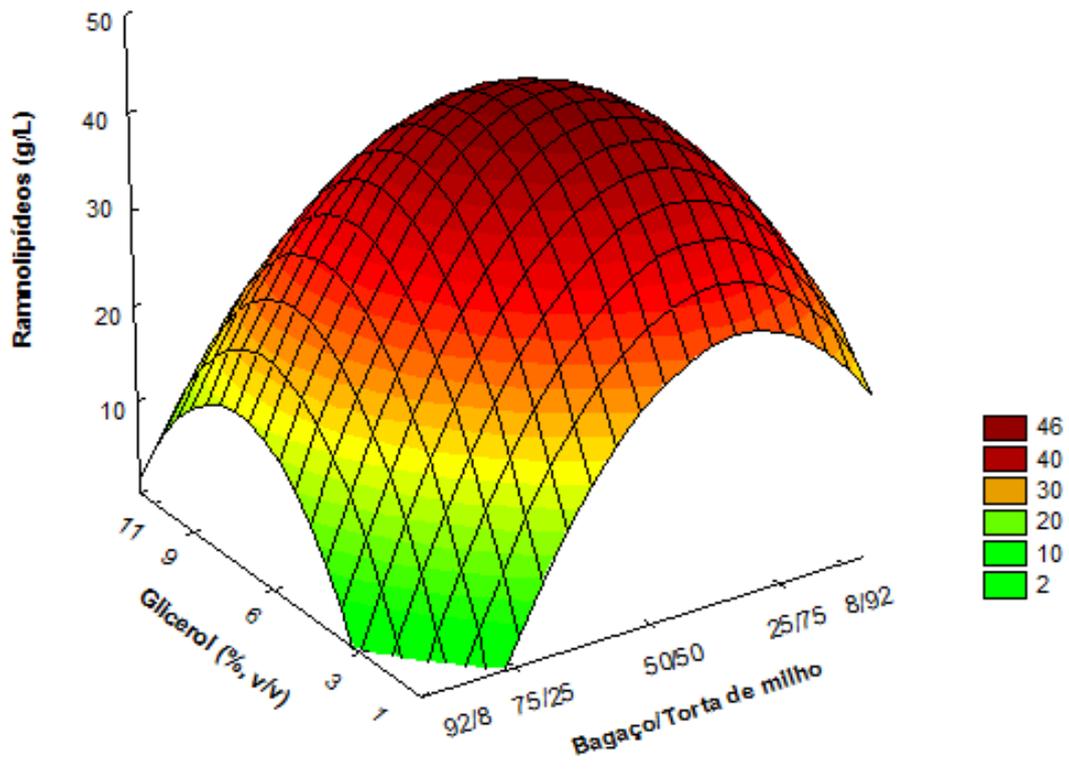
Ensaio	Variáveis independentes codificadas			Concentração de ramnolipídeos em 288 h (g/L)	
	Bgaço/milho	Glicerol	Óleo de soja	Observada (Y)	Predita (Ŷ)
1	-1	-1	-1	13,2	12,2
2	+1	-1	-1	33,3	30,4
3	-1	+1	-1	26,5	24,1
4	+1	+1	-1	23,7	20,3
5	-1	-1	+1	23,6	24,3
6	+1	-1	+1	39,2	38,9
7	-1	+1	+1	26,4	26,6
8	+1	+1	+1	20,9	19,2
9	-1,68	0	0	14,4	14,6
10	+1,68	0	0	20,1	23,7
11	0	-1,68	0	22,4	23,2
12	0	+1,68	0	13,6	16,6
13	0	0	-1,68	29,2	33,6
14	0	0	+1,68	43,4	42,8
15	0	0	0	44,7	45,2
16	0	0	0	46,6	45,2
17	0	0	0	45,9	45,2
18	0	0	0	44,4	45,2

TABELA 17 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS DA TABELA 16

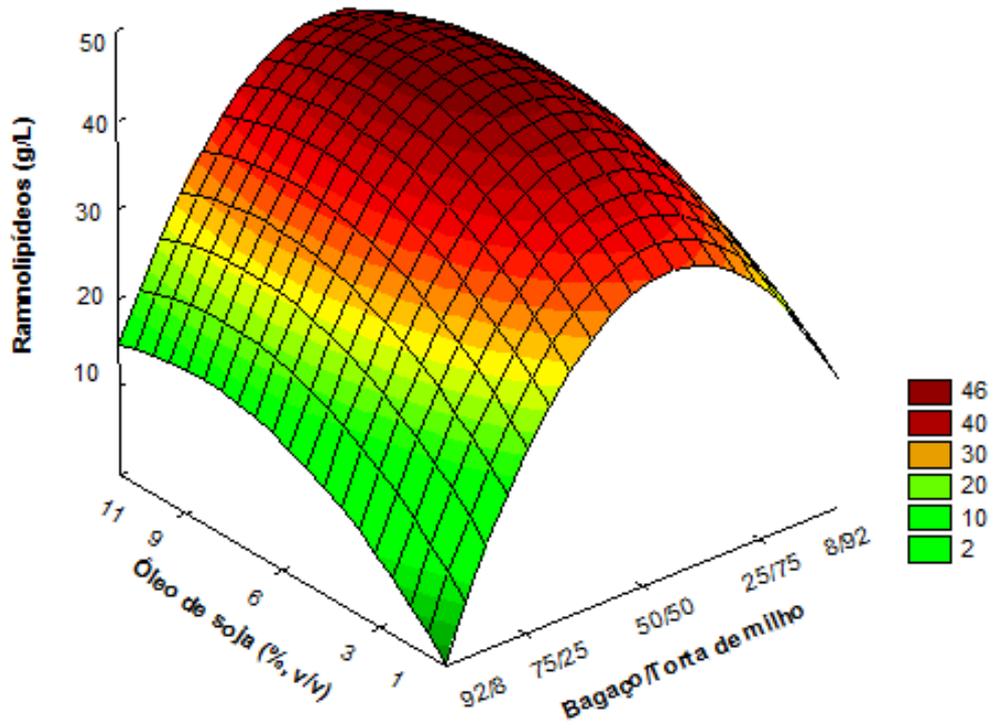
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Regressão	2288,78	9	254,31	26,94	0,000000002
Resíduos	75,54	8	9,44		
Total	2364,32	17			

$F_{9,8,0.05} = 3,39$

A



B



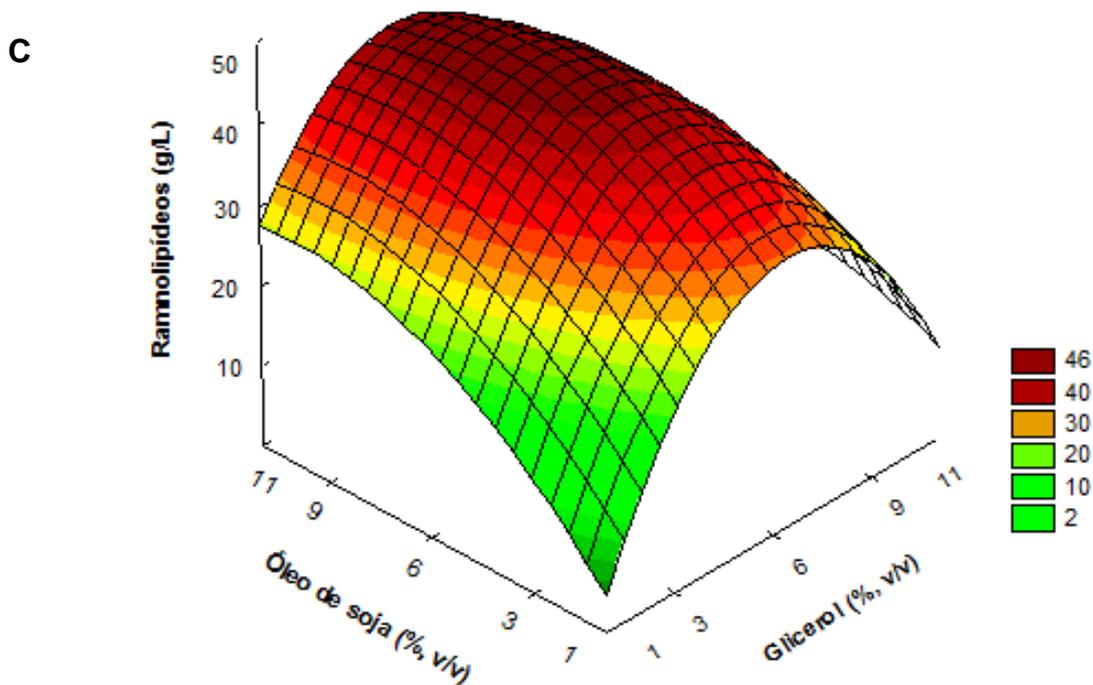


FIGURA 12 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As variáveis independentes são: a proporção relativa de bagaço de cana-de-açúcar/torta de milho e concentração de glicerol e de óleo de soja na solução umedecedora (neste gráfico utilizou-se os valores originais das variáveis). (A) A concentração de óleo de soja foi fixada em 6,0 % (v/v). (B) A concentração de glicerol foi fixada em 6,0 % (v/v). A proporção de bagaço de cana-de-açúcar/torta de milho foi fixada em 50:50 (m/m). A variável resposta é concentração de ramnolipídeos com 288 horas de cultivo, expressa em base de volume de solução umedecedora utilizada (i.e., g/L).

5.11. A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE MILHO SUPLEMENTADOS COM SAIS, GLICEROL E ÓLEO DE SOJA TAMBÉM SE MOSTROU VIÁVEL

A mistura de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho mostrou-se como outra possibilidade de produção de ramnolipídeos por FES. A substituição do farelo de girassol pela torta de milho apresenta certas vantagens: 1) a torta de milho é um subproduto, de baixo valor, da extração do óleo de milho, enquanto o girassol não é subproduto; 2) a torta de milho apresenta um menor custo, e é mais abundante do que o farelo de girassol.

A produção de ramnolipídeos com a utilização da mistura de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho alcançou os mesmos níveis de produção obtidas com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de girassol (46 g/L) quando o óleo de soja foi adicionado ao sistema. A massa de óleo presente na semente de girassol é de aproximadamente 40 % (m/m) e como já relatado, os óleos ou resíduos ricos em óleos são as melhores fontes de carbono e indutores da produção de ramnolipídeos (LINHARDT *et al.*, 1987; LANG; WULLBRANDT, 1999; NITSCHKE *et al.*, 2005b; COSTA *et al.*, 2006; BENINCASA *et al.*, 2002; BENINCASA; ACCORSINI, 2008). Assim, a adição de óleo ao sistema proporcionou bons níveis de produção de ramnolipídeos, tornando viável o uso da mistura de bagaço de cana-de-açúcar e torta de milho.

5.12. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES, EM ESCALA DE BANCADA, SUGEREM QUE FES EM LARGA ESCALA PARA PRODUÇÃO DESTE TENSOATIVO É TECNICAMENTE VIÁVEL

Dado os resultados obtidos com a FES em escala de bancada, a melhor estratégia para produção de ramnolipídeos em larga escala parece ser através do uso de biorreatores de leito estático, com intuito de minimizar danos ao biofilme, o que limita a possibilidade de escolha de reatores em duas opções: 1) bandeja ou 2) leito fixo (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000). Uma vez que Veenadig, Gowthaman e Karanth (2000) não relataram nenhum tipo de problema de formação de espuma com a produção de biossurfactante com um biorreator de FES do tipo leito fixo, pode-se inferir que a aeração forçada na produção de biossurfactantes por FES em larga escala não acarretaria problemas de formação de espuma, o que evitaria a necessidade de se adotar medidas de contenção de espuma. De qualquer forma, o sucesso da produção de ramnolipídeos em escala de bancada, obtido com este trabalho, sugere que a produção em biorreatores de bandeja seja tecnicamente viável. Este tipo de biorreator, apesar requerer intensa mão de obra, tem sido extensivamente utilizado na indústria, sobretudo nos países Asiáticos (DURAND, 2002).

5.13. CARACTERIZAÇÃO DE PROCESSOS “DOWNSTREAM” DOS RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR FES

As propriedades físico-químicas dos ramnolipídeos produzidos por FES foram determinadas a partir do tensoativo produzido por FES nas condições padrão de produção [bagaço de cana-de-açúcar com 3 % (v/v) de glicerol] (Figura 8). Apesar da taxa de produção ser bem menor nesta condição, decidiu-se por utilizá-la, pois com isso evitar-se-ia a interferência de óleo residual (presente no farelo de girassol item 5.3.4 ou óleo de soja adicionado à solução umedecedora item 5.9) no sistema.

5.13.1 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) é um importante parâmetro para avaliação da eficiência de um biossurfactante. Quanto mais eficiente for o biossurfactante, menor será a CMC. A CMC dos ramnolipídeos produzidos por FES foi determinada em função da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas de solução aquosa do extrato orgânico bruto [item 4.2.3 (Materiais e Métodos)]. Construindo-se um gráfico da tensão superficial medida contra a concentração de ramnolipídeos, obteve-se graficamente a CMC, que corresponde ao ponto central de inflexão da curva. A CMC determinada foi de 46,8 mg/L, em uma tensão superficial de 28,3 mN/m (Figura 13). Este valor de CMC está muito próximo da CMC de 44,5 mg/L encontrada por Monteiro *et al.* (2007) para ramnolipídeos produzidos por fermentação submersa pela mesma cepa de *P. aeruginosa* utilizada neste trabalho [o resultado original da CMC reportado por Monteiro *et al.* (2007) foi expresso em mg/L de ramnose, no entanto, para fim de comparação este resultado foi multiplicado por 3,2, que é o fator usado, neste trabalho, para converter concentração de ramnose em concentração de ramnolipídeos, item 4.5.5 (Materiais e Métodos)]. Este resultado sugere que a composição de homólogos de ramnolipídeos obtidos nos dois sistemas é similar.

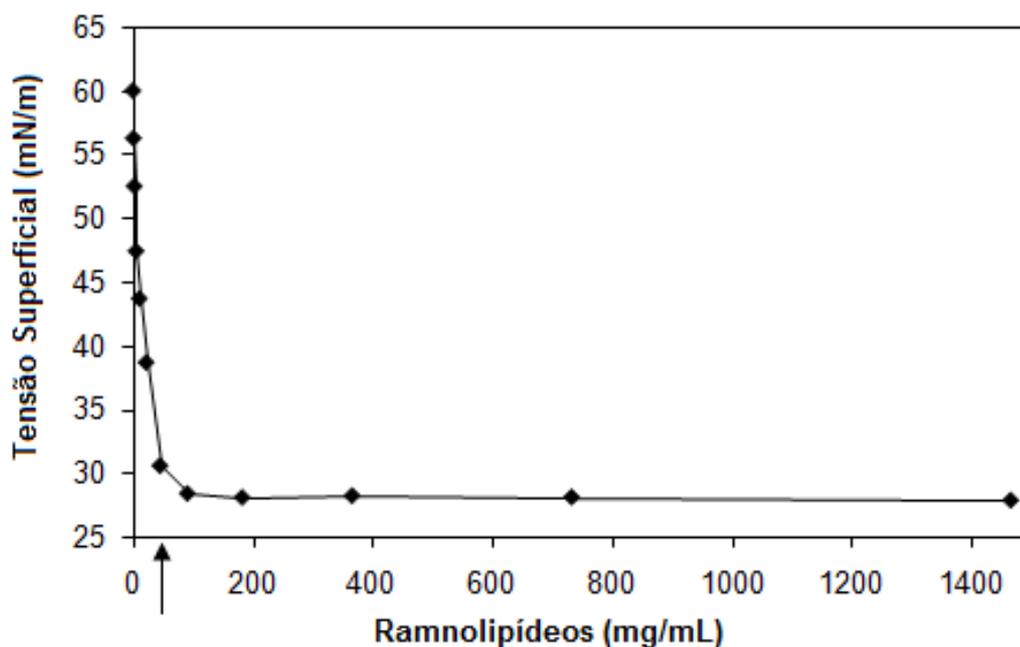


Figura 13 – DETERMINAÇÃO DA CMC A PARTIR DE DILUIÇÕES SERIAIS DE SOLUÇÃO AQUOSA DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *P. aeruginosa* UFPEDA POR FES

A seta indica a CMC (46,8 g/L de ramnolipídeos)

5.13.2 Determinação do índice de emulsificação (E)

O índice de emulsificação (E) foi feito a partir de uma solução de 6,4 g/L de ramnolipídeos. (Figura 14). Os valores de E_{24} para querosene, gasolina e óleo diesel foram superiores a 90 %. As emulsões formadas foram estáveis mesmo depois de 1 mês, com E_{720} por volta de 70 % para querosene, óleo diesel e tolueno e 50 % para gasolina. Estes resultados mostram que os ramnolipídeos produzidos por FES apresentam excelente capacidade emulsificante, assim como mostrado por Monteiro *et al.* (2007) para ramnolipídeos produzidos por fermentação submersa.

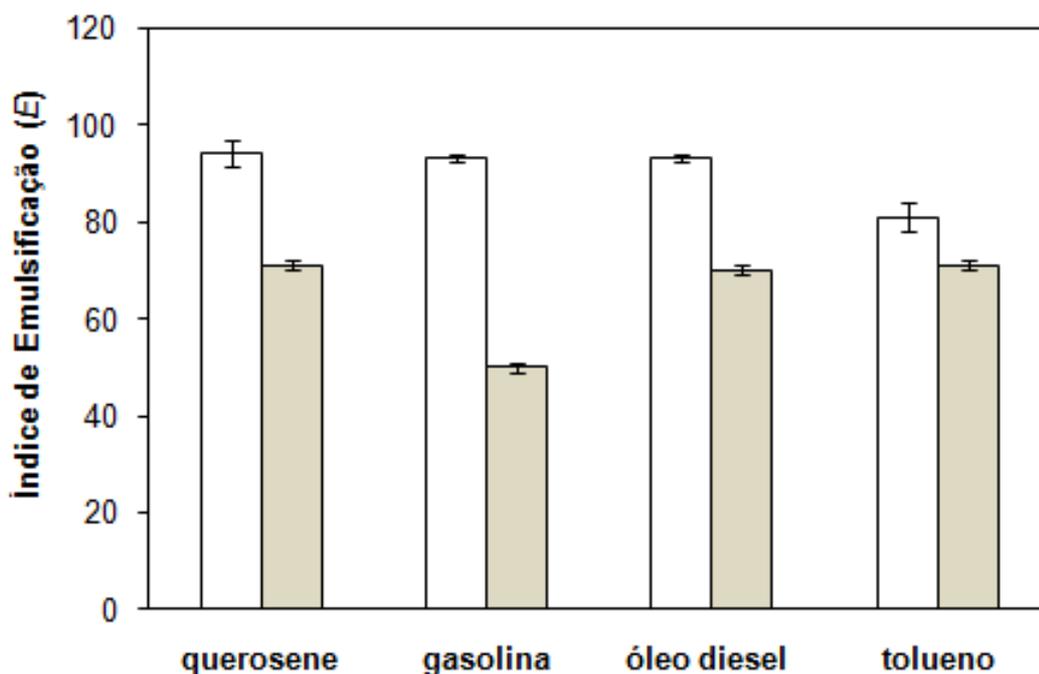


FIGURA 14 – ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO [E, %, APÓS 24 H (BARRAS BRANCAS) E 1 MÊS (BARRAS CINZAS)], COM DIVERSOS HIDROCARBONETOS, A PARTIR DE SOLUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS (6,4 G/L) PRODUZIDOS COM *P. aeruginosa* UFPEDA 614 POR FES

Valores de media obtidas a partir de duplicatas \pm erro padrão

5.13.3. Determinação da concentração micelar crítica (CMC) e do índice de emulsificação (E) das frações mono e di-ramnolípídicas purificadas

Os ramnolípídeos produzidos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 são uma mistura de 6 homólogos mono-ramnolípídeos e 6 homólogos di-ramnolípídeos (MONTEIRO *et al.*, 2007). Assim, decidiu-se separar as duas frações (mono- e di-ramnolípídeos) e determinar separadamente as propriedades tensoativas destas. A Tabela 18 apresenta uma comparação das frações, assim como do extrato orgânico bruto contendo a mistura de mono- e di-ramnolípídeos. Os índices de emulsificação (E_{24}) apresentados na Tabela 18 foram feitos a partir de soluções de ramnolípídeos

de 1,45 g/L, sendo esta a máxima concentração de mono-ramnolipídeos que se conseguiu solubilizar.

A CMC calculada para os mono-ramnolipídeos (31,7 mg/L) foi menor do que a dos di-ramnolipídeos (58,9 mg/L), enquanto que a mistura apresentou um valor intermediário (46,8 mg/L). Em relação ao índice de emulsificação, nenhuma das preparações de 1,45 g/L (mono-ramnolipídeos, di-ramnolipídeos e mistura) apresentou valores de E_{24} equiparáveis aos obtidos contra os mesmos hidrocarbonetos testados com a mistura de ramnolipídeos de concentração de 6,4 g/L (compare resultados da Tabela 18 com os resultados da Figura 14). Para a gasolina, o maior valor de E_{24} foi obtido com a fração di-ramnolipídica (90 %), sendo este valor discretamente menor do que o obtido para a mistura na concentração de 6,4 g/L contra a gasolina. Para os outros hidrocarbonetos, o E_{24} foi maior para a mistura.

TABELA 18 - PROPRIEDADES TENSOATIVAS DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE MONO-RAMNOLIPÍDEOS, DI-RAMNOLIPÍDEOS E DE EXTRATO BRUTO ORGÂNICO DE FERMENTAÇÕES SÓLIDAS

Propriedades tensoativas	Extrato orgânico bruto ("mistura")	Mono-ramnolipídeos	Di-ramnolipídeos
CMC ^a (mg/L ramnolipídeos)	48,3	31,7	58,9
E_{24} ^b			
Gasolina	56,0±2,2	50,0±0,7	90,0±3,5
Diesel	70,0±0,7	37,0±0,7	39,0±0,1
Querosene	71,0±2,1	8,0±0,7	40,0±2,8
Tolueno	74,0±1,4	45,0±0,1	52,0±0,7

^a Concentração Micelar Crítica

^b Soluções aquosas contendo 1,45 g/L de ramnolipídeos

TABELA 19 - EFEITO DA AUTOCLAVAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (121°C POR 15 MIN) NAS PROPRIEDADES TENSOATIVAS

Propriedades tensoativas		Tratamento térmico	
		Teste	Controle
CMC ^a		40,4±2,5	41,6±0,4
E_{24} ^b	Gasolina	49,0±1,4	47,0±0,2
	Diesel	68,0±1,4	68,0±0,1

^a Concentração Micelar Crítica (mg/L- ramnolipídeos) do extrato aquoso de fermentações sólidas

^b Soluções aquosas contendo 0,95 g/L de ramnolipídeos

5.13.4. Efeito do tratamento térmico nas propriedades tensoativas dos ramnolipídeos

Os microrganismos utilizados neste trabalho são cepas de *P. aeruginosa*, bactéria causadora de infecções oportunista em indivíduos imuno-suprimidos (STOVER *et al.*, 2000). Assim, para uma possível produção de ramnolipídeos em escala comercial seria indispensável se obter um produto livre de bactérias viáveis. Neste contexto, com intuito de verificar se um tratamento térmico provocaria a decomposição dos ramnolipídeos com conseqüente perda das propriedades tensoativas, o extrato aquoso do sólido fermentado (contendo ramnolipídeos) foi submetido a diferentes tratamentos térmicos (1 h a 65, 80 ou 100 °C ou autoclavação a 121 °C por 15 min). Os perfis de abaixamento de tensão superficial obtidos por diluições seriadas do extrato original foram essencialmente idênticos, assim como os valores de CMC obtidos. Esta alta estabilidade ao tratamento térmico apresentada pelos ramnolipídeos também foi recentemente confirmada por Pornsunthorntawee *et al.* (2008).

Adicionalmente, testou-se o efeito direto da autoclavação do sólido fermentado contendo ramnolipídeos (121 °C por 15 min) antes da extração. Este teste teve como objetivo verificar se as altas temperaturas poderiam causar algum tipo de reação ou interação entre os ramnolipídeos e componentes do sólido e conseqüentemente acarretar em diminuição ou perda de propriedades tensoativas. No entanto, mais uma vez, os resultados tanto de CMC como de E_{24} foram essencialmente idênticos aos resultados apresentados pelo experimento controle,

sem autoclavação (Tabela 19). Este resultado mostrou que o tratamento térmico do sólido fermentado, utilizado para esterilizá-lo, não afetou as propriedades dos ramnolipídeos presentes neste sólido.

5.13.5. Propriedades tensoativas dos ramnolipídeos produzidos por FES

Os experimentos feitos com as frações mono- e di-ramnolipídicas mostraram que as propriedades tensoativas do biossurfactante são dependentes da composição de homólogos (Tabela 18). Os ramnolipídeos produzidos por FES apresentaram propriedades tensoativas e emulsificantes similares às apresentadas pelos produzidos por fermentação submersa. Este resultado não era esperado *a priori*. Seria possível que as condições ambientais diferentes, as quais o microrganismo foi submetido durante a FES e a fermentação submersa, proporcionassem composições de biossurfactante diferentes o suficiente para modificar significativamente as propriedades tensoativas destes.

Nenhuma vantagem particular foi obtida com a separação das frações mono- e di-ramnolipídicas. Quando comparados, sob a mesma concentração de ramnolipídeos, a mistura apresentou uma eficiência emulsificante mais consistente contra os hidrocarbonetos testados. Apenas a mistura proporcionou resultados E_{24} superiores a 50 % para todos os hidrocarbonetos testados.

As propriedades tensoativas dos extratos brutos, extratos purificados e homólogos específicos de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* têm sido estudadas e relatadas na literatura. A CMC dos ramnolipídeos depende de ambas as porções hidrofílicas (ramnose) e hidrofóbicas (ácidos graxos) da molécula. No caso dos ácidos graxos, o esperado é que moléculas com cadeias mais longas e insaturadas apresentem menor solubilidade e, portanto, uma menor CMC (NITSCHKE *et al.*, 2005b). No caso das unidades de ramnose, o esperado é que uma unidade extra de L-ramnose nos di-ramnolipídeos faça com que estes sejam mais solúveis em água que os mono-ramnolipídeos. Conseqüentemente, uma maior concentração de di-ramnolipídeos é solúvel na água antes da formação das micelas,

portanto, os valores de CMC devem ser maiores (ABALOS *et al.*, 2001). Os resultados obtidos neste trabalho, com os experimentos que utilizaram preparações dos homólogos mono-ramnolipídeos (CMC de 31,7 mg/L) e dos homólogos di-ramnolipídeos (CMC de 58,9 mg/L), estão de acordo com estes princípios. Por outro lado, resultados reportados para preparados de L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxi-decanoato ($R_1C_{10}C_{10}$) e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxi-decanoato ($R_2C_{10}C_{10}$) diferem desses princípios. Por exemplo, Syldatk *et al.* (1985) obteve uma CMC para $R_1C_{10}C_{10}$ de 20 mg/L, maior que o valor da CMC encontrada para $R_2C_{10}C_{10}$ (10 mg/L). Em trabalhos um pouco mais recentes Parra *et al.* (1989) obtiveram os mesmos 11 mg/L de CMC para $R_1C_{10}C_{10}$ e para $R_2C_{10}C_{10}$, enquanto Sim *et al.* (1997) obtiveram uma CMC de 40 mg/L para as mesmas moléculas $R_1C_{10}C_{10}$ e $R_2C_{10}C_{10}$. É importante notar que não é possível comparar os valores absolutos de CMC destes trabalhos, uma vez que expressam seus resultados algumas vezes em equivalente de ramnose e outras em concentração de ramnolipídeos e nem sempre fica muito claro qual foi a base utilizada.

5.14. ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE *P. aeruginosa* PAO1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Diferentes níveis de produção de ramnolipídeos têm sido alcançados com diferentes cepas de *P. aeruginosa* (TRUMMER; EFFENBERGER; SYLDATK, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007; ROONEY, 2009). Dentre as cepas utilizadas para produção de ramnolipídeos, não é comum encontrar *P. aeruginosa* PAO1, uma vez que esta cepa não é uma boa produtora. Por outro lado, *P. aeruginosa* PAO1, originalmente isolada na Austrália a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955), é a cepa de *P. aeruginosa* mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais. Adicionalmente, esta cepa apresenta o genoma completamente seqüenciado e publicado (STOVER *et al.*, 2000), assim como *chip* de microarranjos comercialmente disponível (*microarray chip* - Affymetrix GeneChip®).

Dentro deste contexto, optou-se por utilizar a cepa PAO1 neste estudo de análise do transcriptoma de *P. aeruginosa* durante a produção de ramnolipídeos. Esta parte do trabalho dividiu-se em três passos: primeiro foi feito um estudo de produção de ramnolipídeos por PAO1 em fermentação submersa, no intuito de padronizar as condições ideais para obtenção de concentrações razoáveis de ramnolipídeos; segundo, duas condições foram selecionadas para se realizar os estudos de expressão gênica; e, terceiro, fez-se os ensaios de hibridização dos microarranjos de DNA nas condições selecionadas. A diferença entre as duas condições selecionadas foi a presença ou ausência de caseinato de sódio no meio de cultivo. Esta escolha baseou-se no trabalho de Sandoz *et al.* (2007), que utilizou caseinato de sódio como única fonte de carbono para estimular o circuito *quorum sensing* (QS) de *P. aeruginosa*. Eles relataram que, para *P. aeruginosa* crescer em caseína, é indispensável a expressão de proteases extracelulares quorum-controladas (SANDOZ *et al.*, 2007).

5.14.1. Estudos iniciais: teste com diferentes fontes de carbono para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PAO1

O estudo de produção de ramnolipídeos, aqui apresentado, baseou-se na utilização de diferentes fontes e misturas de fontes de carbono (Tabela 20). O melhor resultado, após 240 h de cultivo, foi obtido com a mistura de glicerol e caseinato de sódio (9,3 g/L). As misturas “glicerol e caseína hidrolisada” e “glicerol e casamino ácidos” apresentaram níveis menores de produção (5,6 e 5,7 g/L, respectivamente) (Tabela 20). Analisados conjuntamente, estes resultados sugerem que o aumento na produção de ramnolipídeos não está apenas relacionado a uma suplementação nutricional, pois se fosse apenas nutricional a suplementação com a proteína ou com seus derivados apresentaria níveis de produção mais próximos. Outro fator aqui relacionado é o fato de que, para que o microrganismo cresça em meio suplementado com caseinato de sódio e o consuma, é necessário que este expresse proteases extracelulares para a hidrólise da proteína. Uma vez que as proteases extracelulares de *P. aeruginosa* são quorum-reguladas, o uso da proteína

no meio de cultivo teve, também, função de ativação do sistema QS (SANDOZ *et al.*, 2007).

Os perfis de crescimento da cepa PAO1 no meio suplementado com a proteína ou com seus derivados foram similares, exceto pela maior fase *lag* apresentada pelos cultivos que utilizaram proteína íntegra (Figura 15). Este atraso pode ser explicado pela necessidade da expressão prévia de genes do sistema QS, que, por sua vez, depende de um mínimo de densidade celular e da expressão de *rpoS* (*rpoS* - fator de ativação de expressão de fase estacionária) (SCHUSTER *et al.*, 2003; SCHUSTER *et al.*, 2004; SCHUSTER; GREENBURG, 2007; SANDOZ *et al.*, 2007).

TABELA 20 – EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DA FONTE DE CARBONO NAS TAXAS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Fonte de carbono	Ramnolipídeos (g/L) após 240 h de cultivo ^a
Glicerol (4 %, m/v)	0,64±0,11
Glicerol (3 %, m/v) + óleo de soja (1 %, m/v)	0,30±0,06
Caseinato de sódio (1 %, m/v)	ND ^b
Glicerol (3 %, m/v) + caseinato de sódio (1 %, m/v)	9,32±0,44
Glicerol (3 %, m/v) + casamino ácidos (1 %, m/v)	5,56±0,21
Glicerol (3 %, m/v) + caseína hidrolisada (1 %, m/v)	5,72±0,11
Óleo de soja (3%, m/v) + caseinato de sódio (1%, m/v)	3,09±0,24
Glicerol (1,5 %, m/v) + óleo de soja (1,5 %, m/v) + caseinato de sódio (1 %, m/v)	4,27±1,41

^a As concentrações de ramnolipídeos são referentes aos valores médios das concentrações obtidas a partir de triplicatas ± erro padrão

^b Não detectado (Valor inferior a sensibilidade de método empregado)

Com o intuito de se obter uma maior ativação dos genes do sistema QS, testou-se o uso de caseinato de sódio como única fonte de carbono, no entanto, a proteína sozinha não foi suficiente para proporcionar produção de ramnolipídeos

(Tabela 20). Por outro lado, glicerol como única fonte de carbono proporcionou pequenos níveis de produção de ramnolipídeos (0,64 g/L, Tabela 20). Adicionalmente, testou-se suplementar o meio de cultivo com óleo de soja. O consumo de triacilgliceróis depende da expressão de lipases extracelulares. Estas enzimas hidrolisam os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol que então serão transportados e consumidos pelo microrganismo. A expressão das lipases extracelulares de *P. aeruginosa* sofre também modulação positiva pelos genes expressos no sistema QS (REIMMANN *et al.*, 1997; SCHUSTER; GREENBURG, 2006), assim o óleo de soja pôde ser utilizado com o mesmo propósito do caseinato de sódio. Porém, os meios de cultivo contendo óleo apresentaram uma camada de óleo na superfície do líquido que, com o crescimento da bactéria e conseqüente produção de ramnolipídeos, evoluiu para uma emulsão. Assim, a adição de óleo

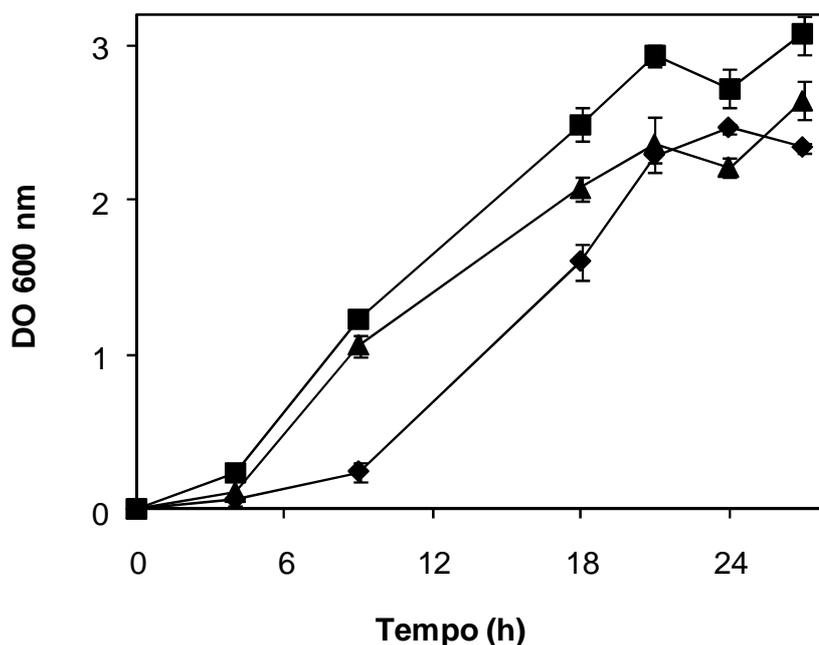


FIGURA 15 - CURVAS DE CRESCIMENTO de *P. aeruginosa* PAO1 A PARTIR DE MEIO SUPLEMENTADO COM CASEÍNA E SEUS DERIVADOS

Meio utilizado e condições de cultivo: experimento realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% m/v de glicerol, suplementados com 1 % m/v com: (◆) caseinato de sódio; (■) caseína hidrolisada; e (▲) casamino ácidos. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 37°C/ 200 rpm (os valores plotados são referentes às médias de triplicatas \pm erro padrão).

ao meio de cultivo ocasionou uma perda significativa da homogeneidade do meio e, por conseguinte, uma queda na eficiência de transferência de oxigênio e dióxido de carbono entre as fases líquidas e gasosas do cultivo. Conseqüentemente, o uso de óleo de soja não proporcionou bons níveis de produção de ramnolipídeos, sendo que a mistura glicerol e óleo de soja apresentou o menor índice de produção deste estudo (Tabela 20). Por outro lado, uma melhora nas taxas de produção de ramnolipídeos foi obtida quando se adicionou caseinato de sódio aos meios que continham óleo (Tabela 20). Este fato pode ser explicado pelo aumento de homogeneidade do meio, visualmente observada, proporcionado pela adição de caseinato de sódio à mistura, uma vez que este apresenta capacidade de formar micelas.

5.14.2 Escolha das condições teste e controle para os ensaios de microarranjo

Como mencionado no item anterior, altos níveis de produção de ramnolipídeos foram alcançados com a suplementação de caseinato de sódio no meio de cultivo que continha 3% (m/v) glicerol. Comparando-se este resultado com os resultados obtidos com o meio contendo 3% (m/v) glicerol como única fonte de carbono, pode-se observar um incremento na produção de ramnolipídeos superior a 10 vezes (Tabela 20). Este aumento na produção, em conjunto com a diferença na produção de ramnolipídeos obtida entre o uso da proteína e seus derivados (Tabela 20), permitiu a elaboração da hipótese deste estudo transcricional: O aumento de mais de 10 vezes na produção de ramnolipídeos alcançado com a suplementação do meio de cultivo com caseinato de sódio pode ser resultado de um efeito sinérgico entre a suplementação nutricional do meio de cultivo e a maior expressão de genes do sistema QS. Assim, para se testar esta hipótese, escolheram-se duas condições para se realizar os experimentos de expressão gênica, utilizando-se microarranjos de DNA: a) meio suplementado com caseinato de sódio (condição teste) e b) meio contendo glicerol como única fonte de carbono (condição controle). Estes experimentos tiveram como objetivo verificar a transcrição diferencial de todo genoma de PAO1, na presença e ausência de caseinato de sódio no meio de cultivo.

5.14.3 Produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PAO1 em meio de cultivo suplementado com caseinato de sódio

Quando *P. aeruginosa* PAO1 foi cultivada na presença de caseinato de sódio (Figura 16), nas primeiras 24 horas de cultivo quase nenhuma produção de ramnolipídeos foi detectada (Figura 16). Por outro lado, entre 24 h e 144 h uma intensa e linear produção de ramnolipídeos pode ser observada. Este resultado

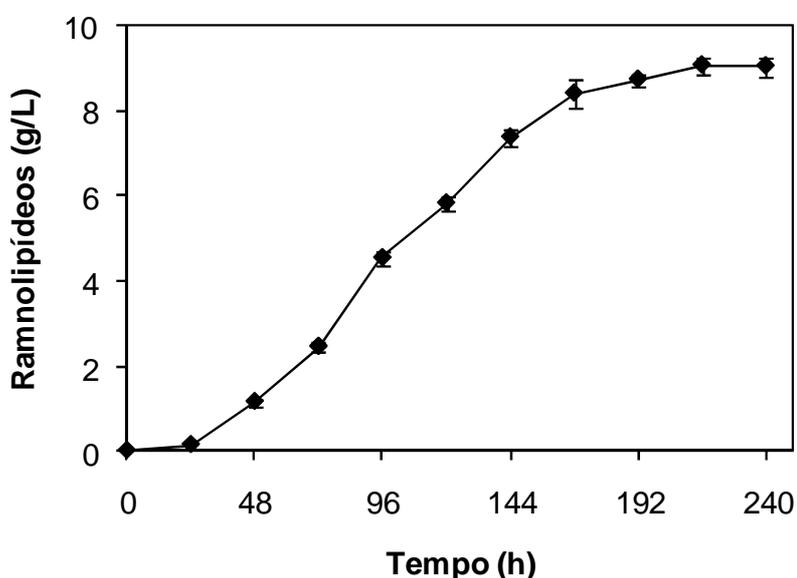


FIGURA 16 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *P. aeruginosa* PAO1 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Meio utilizado e condições de cultivo: experimento realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 % m/v de glicerol e 1% de caseinato de sódio, incubados em agitador orbital a 37°C/ 200 rpm (os valores plotados são referentes às médias de triplicatas \pm erro padrão);

sugeriu que um período interessante para se avaliar o transcriptoma da PAO1 seria entre 24 h e 48 h, quando iniciou-se a produção de ramnolipídeos. Não se cogitou a escolha de tempos superiores a 48 h por vários motivos: 1) como mencionado, com 48 h de cultivo a velocidade de produção de ramnolipídeos já era máxima; 2) a eficiência das extrações de RNA (quantidade e qualidade) decresce com o decorrer dos cultivos, ou seja, com o passar do tempo obtém-se menos RNA por montante de

células, e a probabilidade de se obter RNA degradado também é maior; e 3) a proporção de RNA mensageiro/RNA total decresce com o passar do tempo de cultivo.

5.14.4 Identificação de genes com expressão diferencial na presença e ausência de caseinato de sódio

Ensaio de hibridização de microarranjos de DNA (Affymetrix GeneChip® *P. aeruginosa* genome array) foram feitos no intuito de se comparar os perfis transcricionais obtidos após cultivo de PAO1 em meio com presença de caseinato de sódio (condição teste) e ausência de sódio caseinato (condição controle) (como mencionado no item 5.14.2). Estes ensaios foram realizados para ambos (teste e controle) em dois pontos da curva de crescimento de PAO1, após 30 e 48 horas de cultivo (t_{30} e t_{48} , respectivamente) (Figura 17). Grandes diferenças nos perfis transcricionais foram encontradas em ambos os casos (Figura 18).

Optou-se por selecionar genes que apresentassem expressão diferencial entre as condições teste e controle maior que 2 vezes, para ambos os tempos t_{30} e t_{48} , e sempre com o “teste” e o “controle” no mesmo tempo de cultivo (teste- t_{30} /controle- t_{30} e teste- t_{48} /controle- t_{48}). A normalização das condições de hibridização dos microarranjos de DNA e a quantificação da expressão gênica das condições teste e controle foram feitas com o software GeneSpring GX 10.0.2 (Agilent Technology). Esta triagem de genes diferencialmente expressos foi feita com o intuito de se traçar um perfil de expressão de genes que pudessem estar direta ou indiretamente correlacionados com o aumento da biossíntese de ramnolipídeos. Com as condições apresentadas acima, 400 genes responderam à presença de caseinato de sódio no meio de cultivo no tempo de 30 h e 837 genes se apresentaram diferencialmente expressos com 48 h, sendo 207 genes em comum em ambos os tempos de cultivo. Assim, 1030 genes (562 ativados e 468 reprimidos) apresentaram expressão diferencial na presença de caseinato de sódio no meio de cultivo. Adicionalmente, 11 regiões intergênicas (6 ativadas e 5 reprimidas) responderam à presença de caseinato de sódio no meio de cultivo.

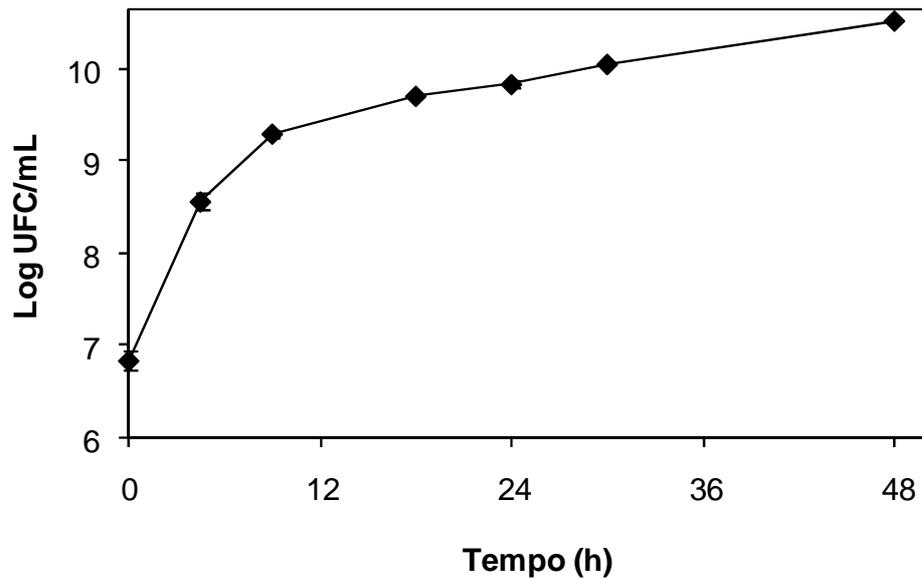
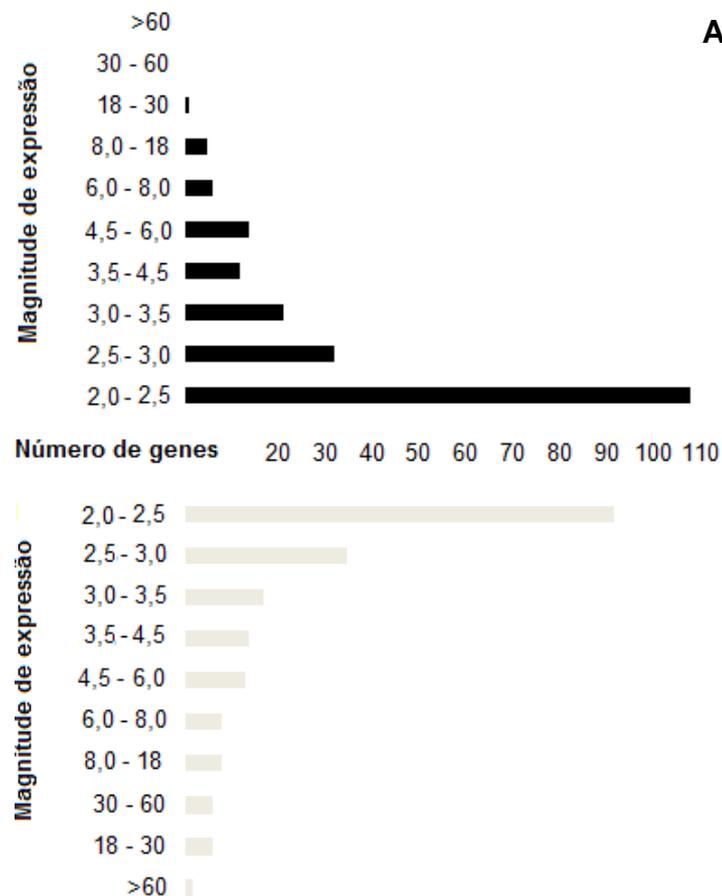


FIGURA 17 – CURVA DE CRESCIMENTO DE *P. aeruginosa* PAO1

Meio utilizado e condições de cultivo: experimento realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 % m/v de glicerol e 1% de caseinato de sódio, incubados em agitador orbital a 37°C/ 200 rpm (os valores plotados são referentes às médias de triplicatas \pm erro padrão);



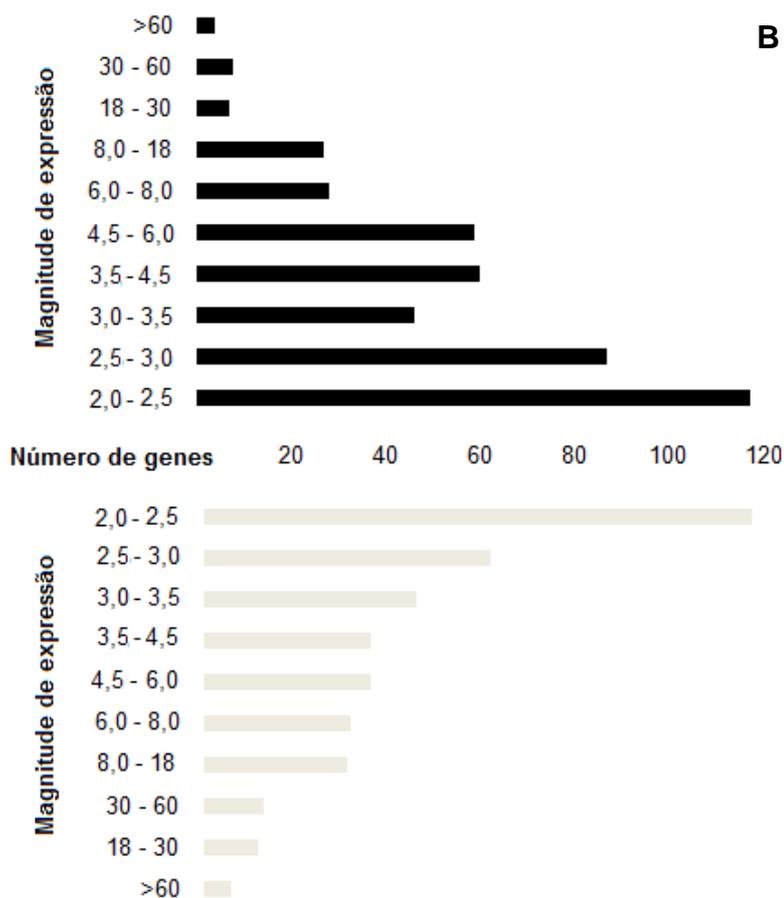


FIGURA 18 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RESPOSTA A PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO DE ACORDO COM A MAGNITUDE DA TRANSCRIÇÃO

A distribuição dos genes foi feita de acordo com a magnitude da expressão diferencial [o número de vezes que o teste (presença de caseinato no meio de cultivo) foi expresso a mais ou a menos que o controle (ausência de caseinato no meio de cultivo)]. (A) 30 horas de cultivo (t_{30}); (B) 48 horas de cultivo (t_{48}); (■) genes super-expressos; (■) genes reprimidos. Os genes foram agrupados de acordo com a magnitude da expressão diferencial em grupos de: 2,0- a 2,5-; 2,5- a 3,0-; 3,0- a 3,5-; 3,5- a 4,5-; 4,5- a 6,0-; 6,0- a 8,0-; 8,0- a 18-; 18- a 30-; 30- a 60-; e com a expressão mais de 60-vezes maior ou menor

Diferentes magnitudes de expressão, dos genes que responderam à presença da proteína no meio, foram identificadas nos dois tempos de cultivo (Figura 18). Como pode ser observado na Figura 18, aproximadamente 200 genes em cada um dos tempos de cultivo (t_{30} e t_{48}) exibiram expressão diferencial entre 2,0- a 2,5-vezes

(2,0>teste/control<2,5), tanto genes ativados como reprimidos. Entretanto, para valores de expressão diferencial entre 2,5-vezes e mais que 60-vezes, o tempo de 48 h (t_{48}) apresentou um maior número de genes tanto ativados como reprimidos (Figura 18). Seiscentos genes apresentaram expressão diferencial > 2,5-vezes em t_{48} , 326 dos quais foram ativados e 274 reprimidos. Adicionalmente, com 48 horas de cultivo, 50 genes responderam ao estímulo acima de 18-vezes, 19 dos quais foram ativados e 31 reprimidos (Figura 18 B). Por outro lado, com 30 horas de cultivo 200 genes apresentaram expressão diferencial maior de 2,5-vezes, 91 dos quais foram ativados e 109 reprimidos (Figura 18 A). Adicionalmente, neste tempo de cultivo, 29 genes responderam ao estímulo acima de 18-vezes, sendo 1 promovido e 28 reprimidos (Figura 18 A).

5.14.5 Identificação de genes envolvidos em diferentes processos fisiológicos¹, com expressão diferencial em resposta à presença de caseinato de sódio no meio de cultivo

Os perfis de transcrição exibiram significativas diferenças relativas ao tempo de cultivo de PAO1 (30 e 48 horas). Estas diferenças podem ser vistas no número de genes que responderam ao estímulo, na magnitude de expressão destes genes (Figura 18) e na variação de quais genes apresentaram expressão diferencial (aproximadamente 50% dos genes que responderam à presença da proteína com 30 horas de cultivo não responderam com 48 h de cultivo). Por outro lado, quando os transcriptomas foram analisados como grupos de genes com mesma função fisiológica, o tempo de cultivo não influenciou significativamente. Assim, a porcentagem total de genes de um determinado grupo de genes (ou seja, um conjunto de genes que codificam para proteínas com a mesma função fisiológica)

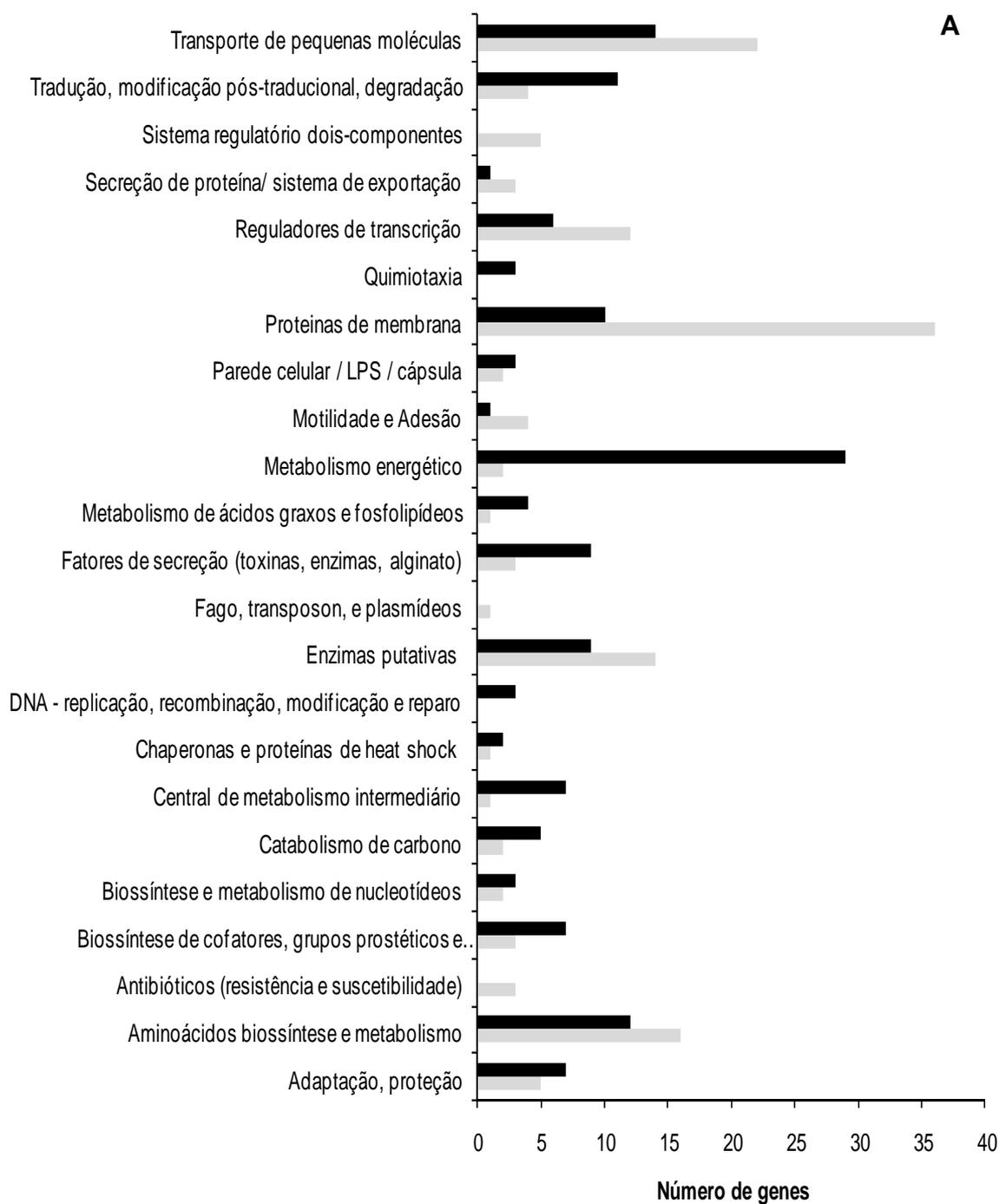
¹ A classificação funcional dos genes apresentada no texto, nas Figuras 18 e 19 e nas Tabelas de 21 a 27 foi feita através de informações obtidas pelo próprio *GeneChip*® (Affymetrix GeneChip® *P. aeruginosa* genome array)

não sofreu grandes alterações de 30 para 48 horas de cultivo (Figuras 19 e Tabelas 21 a 27). Em outras palavras, ocorreram substituições de genes de mesma classe funcional, porém sem mudar a proporção total dos genes. Assim, genes de mesma classe funcional com expressão diferencial em t_{30} foram substituídos por outros genes mas do mesmo grupo funcional em t_{48} (Tabelas 21 a 27).

Uma porcentagem significativa dos transcritos identificados codifica para proteínas hipotéticas, não classificadas e com funções desconhecidas. Em t_{30} estes genes representaram 40 % do total dos genes diferencialmente expressos (>2 vezes), (76 super-expressos e 84 reprimidos). Já em relação a t_{48} , foram 34,5 % (155 super-expressos e 134 reprimidos). Esta porcentagem é similar à porcentagem de proteínas hipotéticas, não classificadas e com funções desconhecidas encontradas no genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (46 %) (Pseudomonas Genome Database - www.pseudomonas.com).

Um grande número de genes com funções classificadas foi fortemente influenciado pela suplementação de caseinato de sódio no meio de cultivo. Estes genes estão envolvidos em processos celulares básicos como, transporte de substratos, metabolismo energético, biossíntese e metabolismo de aminoácidos e regulação transcricional, entre outros (Figura 19 e Tabelas 21 a 27). A resposta de cada um dos grupos funcionais, que apresentaram maior número de genes diferencialmente transcritos será discutida individualmente, a seguir (Tabelas 23 a 27).

A classe funcional que apresentou maior número de genes diferencialmente expressos em resposta à suplementação de caseinato de sódio foi a que codifica para proteínas de membrana (Figura 19). Um pouco mais de 16 % dos genes com funções conhecidas e diferencialmente expressos em t_{30} (47 genes, 10 super-expressos e 37 reprimidos, Tabela 21) e 17 % em t_{48} (113 genes, 42 super-expressos e 71 reprimidos, Tabela 22) são genes que codificam para proteínas de membrana (Tabela 23).



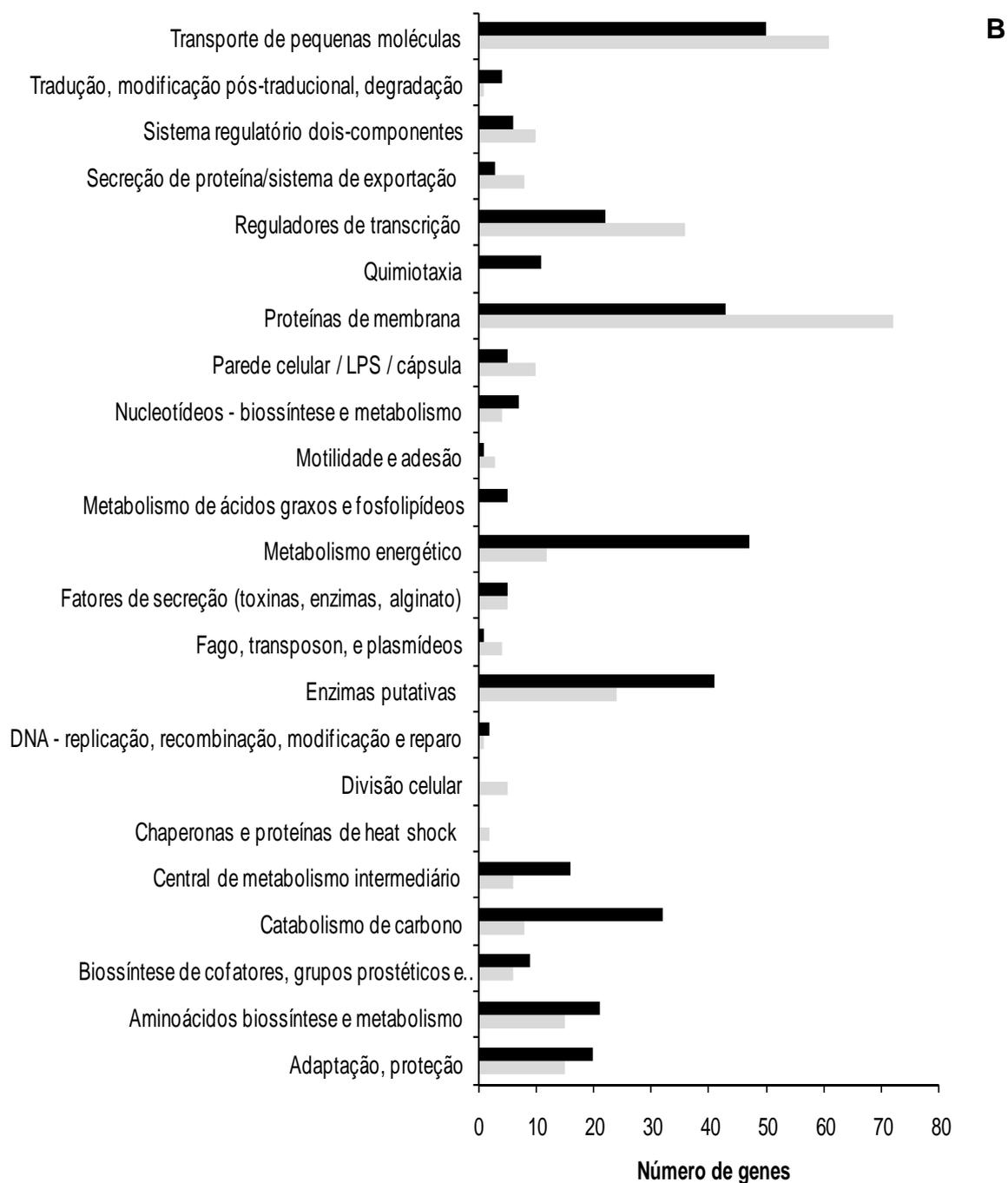


FIGURA 19 – CLASSES FUNCIONAIS DE GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RESPOSTA À PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO

Os genes estão agrupados de acordo com as classes funcionais. (■) genes ativados e (■) genes reprimidos; (A) 30 horas de cultivo e (B) 48 horas de cultivo

TABELA 21 -CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS DESEMPENHADOS PELOS PRODUTOS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR PAO1 APÓS 30 HORAS DE CULTIVO NA PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO

Funções Fisiológicas	Genes	Genes	%
	Reprimidos	Ativados	Total ^a
Adaptação, proteção	5	7	4,2
Aminoácidos - biossíntese e metabolismo	16	12	9,7
Antibióticos - resistência e suscetibilidade	3	-	1,0
Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores	3	7	3,5
Biossíntese e metabolismo de nucleotídeos	2	3	1,7
Catabolismo de carbono	2	5	2,4
Central de metabolismo intermediário	1	7	2,8
Chaperonas e proteínas de heat shock	1	2	1,0
DNA - replicação, recombinação, modificação e reparo	-	3	1,0
Enzimas putativas	14	9	8,0
Fago, transposon, e plasmídeos	1	-	0,3
Fatores de secreção (toxinas, enzimas, alginato)	3	9	4,2
Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídeos	1	4	1,7
Metabolismo energético	2	29	10,8
Motilidade e Adesão	4	1	1,7
Parede celular / LPS / cápsula	2	3	1,7
Proteínas de membrana	37	10	16,3
Quimiotaxia	-	3	1,0
Reguladores de transcrição	12	6	6,3
Secreção de proteína/ sistema de exportação	3	1	1,4
Sistema regulatório dois-componentes	5	-	1,7
Tradução, modificação pós-traducional, degradação	4	11	5,2
Transporte de pequenas moléculas	22	14	12,5

^a Porcentagem total de genes diferencialmente expressos por PAO1 (reprimidos e ativados) que responderam a adição de caseinato de sódio no meio de cultivo e dentro dos grupos de genes com funções conhecidas do genoma de *P. aeruginosa* PAO1

Genes selecionados a partir do critério: relação intensidade de hibridização-normalizada teste/controle maior que 2 vezes (teste, presença de caseinato de sódio no meio de cultivo; e controle, ausência de caseinato de sódio no meio de cultivo)

TABELA 22 - CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS DESEMPENHADOS PELOS PRODUTOS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR PAO1 APÓS 48 HORAS DE CULTIVO NA PRESENÇA DE CASEINATO DE SÓDIO

Funções Fisiológicas	Genes	Genes	%
	Reprimidos	Ativados	Total ^a
Adaptação, proteção	15	20	5,3
Aminoácidos - biossíntese e metabolismo	15	21	5,4
Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores	6	9	2,3
Biossíntese e metabolismo de nucleotídeos	4	7	1,7
Catabolismo de carbono	8	32	6,0
Central de metabolismo intermediário	6	16	3,3
Chaperonas e proteínas de heat shock	2	-	0,3
Divisão celular	5	-	0,8
DNA - replicação, recombinação, modificação e reparo	1	2	0,5
Enzimas putativas	24	43	10,1
Fago, transposon, e plasmídeos	4	1	0,8
Fatores de secreção (toxinas, enzimas, alginato)	5	5	1,5
Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídeos	-	5	0,8
Metabolismo energético	12	47	8,9
Motilidade e Adesão	3	1	0,6
Parede celular / LPS / cápsula	10	5	2,3
Proteínas de membrana	71	42	17
Quimiotaxia	-	11	1,7
Reguladores de transcrição	36	22	8,7
Secreção de proteína/ sistema de exportação	8	3	1,7
Sistema regulatório dois-componentes	10	6	2,4
Tradução, modificação pós-traducional, degradação	3	4	1,1
Transporte de pequenas moléculas	61	50	16,7

^a Porcentagem total de genes diferencialmente expressos por PAO1 (reprimidos e ativados) que responderam a adição de caseinato de sódio e dentro dos grupos de genes com funções conhecidas do genoma de *P. aeruginosa* PAO1

Genes selecionados a partir do critério: relação intensidade de hibridização-normalizada teste/controle maior que 2 vezes (teste, presença de caseinato de sódio no meio de cultivo; e controle, ausência de caseinato de sódio no meio de cultivo)

TABELA 23 – GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Proteínas de membrana reprimidas com 30 horas de cultivo			
PA0485		3,6	proteína hipotética conservada
PA0567		2,3	proteína hipotética conservada
PA0920		2,2	proteína hipotética
PA1107		2,4	proteína hipotética conservada
PA1115		2,2	proteína hipotética
PA1178	<i>oprH</i>	2,0	proteína externa de membrana precursor H1
PA1513		2,6	proteína hipotética
PA1911		2,2	provável sensor transmembrana
PA2415		2,3	proteína hipotética
PA2435		2,1	provável transportador de cation ATPase tipo-P
PA2437		2,2	proteína hipotética
PA2439		2,5	proteína hipotética
PA2494	<i>mexF</i>	3,0	transportador de efluxo multidrogas
PA2495	<i>oprN</i>	3,1	proteína externa de membrana precursor oprN
PA2761		3,2	proteína hipotética
PA2910		2,1	proteína hipotética conservada
PA2911		4,8	provável receptor TonB-dependente
PA2914		2,8	provável permease de transportador ABC
PA2988		2,0	proteína hipotética conservada
PA3234		2,7	provável transportador de sódio simport
PA340		2,1	provável sensor transmembrana
PA3431		3,2	proteína hipotética conservada
PA3432		2,4	proteína hipotética
PA3557		5,4	proteína hipotética conservada
PA3558		5,6	proteína hipotética conservada
PA3747		2,7	proteína hipotética conservada
PA3888		2,6	provável permease de transportador tipo ABC
PA3890		2,1	provável permease de transportador tipo ABC
PA4065		12,2	proteína hipotética conservada
PA4338		2,7	proteína hipotética
PA4467		2,6	proteína hipotética
PA4834		46,4	proteína hipotética conservada
PA4835		46,5	proteína hipotética conservada
PA4837		82,7	provável proteína externa de membrana
PA5070	<i>tatC</i>	2,0	proteína de transporte
PA5473		2,3	proteína hipotética conservada
PA5501	<i>znuB</i>	5,5	permease de transportador de zinco tipo ABC
Proteínas de membrana super-expressas com 30 horas de cultivo			
PA0276		2,4	proteína hipotética
PA1549		2,1	provável transportador de cátion ATPase tipo-P
PA2068		3,8	provável transportador MFS
PA2929		2,4	proteína hipotética
PA3278		2,7	proteína hipotética
PA3336		2,7	provável transportador MFS
PA3448		2,1	provável transportador tipo ABC
PA3690		7,6	provável ATPase tipo-P
PA5231		2,1	provável ATP ligante/ permease de fusão de transportador ABC

TABELA 23 – GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Proteínas de membrana reprimidas com 48 horas de cultivo			
PA0150		4,7	proteína hipotética
PA0185		2,3	proteína hipotética
PA0281	<i>cysW</i>	8,8	provável permease de transportador tipo ABC
PA0282	<i>cysT</i>	4,7	provável sensor transmembrana
PA0434		2,4	proteína hipotética
PA0471		3,0	proteína hipotética
PA0485		3,3	proteína hipotética
PA0847		2,3	proteína hipotética conservada
PA0920		2,8	proteína hipotética
PA1058		2,2	proteína hipotética
PA1107		2,8	proteína hipotética
PA1115		2,2	proteína hipotética conservada
PA1178	<i>oprH</i>	2,8	proteína hipotética
PA1199		3,1	proteína hipotética
PA1245		2,1	proteína hipotética conservada
PA1301		7,1	proteína hipotética
PA1302		2,7	provável sensor transmembrana
PA1911		4,9	proteína hipotética conservada
PA2051		2,1	proteína hipotética conservada
PA2091		3,3	proteína externa de membrana precursora de H1
PA2092		5,6	provável sensor transmembrana
PA2307		4,4	provável sensor transmembrana
PA2327		2,5	proteína hipotética conservada
PA2331		4,5	proteína hipotética
PA239		6,0	provável transportador sódio/hidrogênio antiporte
PA2390		5,6	provável permease de transportador tipo ABC
PA2397	<i>pvdE</i>	4,8	provável sensor transmembrana
PA2403		3,3	proteína hipotética conservada
PA2435		2,5	proteína externa de membrana
PA2437		2,4	proteína hipotética conservada
PA2439		2,5	proteína hipotética
PA2467		2,0	proteína hipotética
PA2761		3,7	proteína hipotética
PA2910		2,3	proteína hipotética
PA2911		3,5	provável sensor transmembrana
PA2929		9,2	proteína hipotética
PA2988		2,7	proteína hipotética
PA3409		3,8	proteína hipotética conservada
PA3431		4,1	provável lipoproteína
PA3432		3,0	proteína hipotética conservada
PA3443		16,8	provável permease de transportador tipo ABC
PA3448		6,0	provável permease de transportador tipo ABC
PA3557		6,5	proteína hipotética
PA3558		5,8	proteína hipotética
PA3749		2,1	proteína hipotética
PA3789		3,2	proteína hipotética conservada
PA3791		2,4	proteína hipotética
PA3900		4,5	proteína hipotética
PA3936		26,2	provável transportador MFS
PA4046		2,4	proteína hipotética

TABELA 23 – GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Proteínas de membrana reprimidas com 48 horas de cultivo			
PA4065		8,5	proteína hipotética conservada
PA4160	<i>fepD</i>	2,5	provável sensor transmembrana
PA4193		2,0	proteína hipotética
PA4218		2,5	proteína hipotética
PA4219		2,5	proteína hipotética
PA4358		2,5	proteína hipotética
PA4467		10,6	proteína hipotética
PA4601		2,0	proteína hipotética conservada
PA4783		2,8	proteína hipotética
PA4834		35,4	proteína hipotética
PA4835		38,1	proteína hipotética
PA4837		83,9	proteína hipotética conservada
PA4895		13,6	proteína hipotética
PA4961		2,2	proteína hipotética
PA5021		2,2	proteína hipotética
PA5030		2,7	provável sensor transmembrana
PA5103		3,4	proteína hipotética
PA5244		2,2	proteína hipotética
PA5473		2,0	proteína hipotética conservada
PA5501	<i>znuB</i>	6,0	provável transportador MFS
PA5504		3,5	provável sensor transmembrana
Proteínas de membrana super-expressas com 48 horas de cultivo			
PA0103		3,7	provável ATPase tipo-P de transporte de metal
PA0112		2,7	proteína de transporte ferrico enterobactin
PA0137		15,4	provável permease de transportador tipo ABC - transportador de taurina
PA0138		7,3	provável transportador
PA0166		4,8	provável proteína externa de membrana
PA0188		2,2	provável transportador
PA0276		2,9	provável permease de transportador tipo ABC
PA0325		2,1	provável transportador de sulfato
PA0443		9,3	transportador de amônio
PA0605		2,7	provável transportador MFS
PA0811		2,3	transportador de nitrato
PA1190		5,4	provável permease de transportador tipo ABC
PA1507		2,9	transportador de arginina/ornitina antiporte
PA1783	<i>nasA</i>	4,2	provável permease de transportador de zinco ZnuB tipo ABC
PA1895		6,8	provável permease de transportador tipo ABC
PA1897		7,6	provável receptor TonB-dependente
PA2004		21,6	provável permease de transportador tipo ABC
PA2006		9,2	provável permease de transportador tipo ABC
PA2068		4,8	provável permease de transportador tipo ABC
PA2135		2,6	proteína CysT de transporte de sulfato
PA2148		4,2	provável transportador
PA2369		3,7	provável permease de transportador aminoácidos ramificado tipo ABC
PA2663		2,6	provável ATPase tipo-P de transporte de cations
PA3039		2,7	provável transportador
PA3231		3,5	provável precursora de utilização de heme

TABELA 23 – GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Proteínas de membrana super-expressas com 48 horas de cultivo			
PA3234		3,5	provável ATP ligante/ permease de fusão de transportador ABC
PA3235		2,1	provável permease de transportador tipo ABC
PA3252		3,0	provável transportador MFS
PA3253		2,6	provável permease de transportador tipo ABC
PA3369		6,4	provável transportador
PA3370		8,3	provável transportador de sódio - soluto simporte
PA3690		5,7	provável transportador MFS
PA4503		2,2	provável permease de transportador tipo ABC
PA4504		3,9	provável permease de transportador tipo ABC
PA4859		13,6	provável permease de transportador tipo ABC
PA4860		27,3	provável permease de transportador tipo ABC
PA4894		2,2	provável transportador de ferro íon ferroso
PA4912		2,7	PvdE proteína de síntese de pioverdina
PA5170	<i>arcD</i>	4,9	proteína CysW transporte de sulfato
PA5194		3,0	provável transportador
PA5287	<i>amtB</i>	13,8	provável permease de transportador tipo ABC
PA5482		4,2	provável transportador MFS

Entre estes genes, uma resposta interessante foi encontrada com a expressão de PA4837. Este gene codifica um transportador ferro-sideróforo, cuja expressão foi intensamente reprimida (mais de oitenta vezes em ambos t_{30} e t_{48}) no meio suplementado com a proteína (Tabela 23). Os sideróforos usualmente são super-expressos quando há limitação de ferro no meio, apresentando a função de aumentar a captação de ferro ambiental pela bactéria (VENTURI *et al.*, 1993; SCHLICTMAN *et al.*, 1995). Como não houve adição de ferro em nenhuma das condições (meio suplementado com caseinato de sódio e meio não suplementado com a proteína), não ficou claro qual é a razão da maior expressão desse sideróforo na ausência do caseinato. Quatro genes que codificam para proteínas de membrana foram super-expressos nos dois tempos de cultivo (PA5287, PA2068, PA3690 e PA0276, que codificam respectivamente, um transportador de membrana, um provável transportador MFS, uma provável ATPase tipo-P e uma proteína hipotética) (Tabela 23). Um destes, o gene PA5287 (*amtB*), codifica um transportador transmembrana de amônio. A transcrição deste transportador é reprimida na presença de amônio (HERVÁS; CANOSA; SANTERO, 2008). No presente trabalho

amtB apresentou uma super-expressão com 30 e 48 horas de cultivo, sendo os maiores níveis de expressão exibidos com 48 horas de cultivo (teste/controle >13 vezes). Este resultado indica que em t_{48} a concentração de amônio era menor no meio suplementado com a proteína, ou seja a velocidade de consumo da fonte salina de nitrogênio (sulfato de amônio para ambos teste e controle) provavelmente foi maior na presença do caseinato de sódio.

Os grupos de genes que codificam proteínas responsáveis pelo transporte de pequenas moléculas, metabolismo energético e reguladores transcricionais também apresentaram alta porcentagem de alteração nos perfis de expressão (Figura 19 e Tabelas 24 a 26). Mais de 12% do total de genes com funções conhecidas em t_{30} (36 genes – 14 super-expressos e 22 reprimidos) (Tabela 21) e 16,7 % em t_{48} (111 genes – 50 super-expressos e 61 reprimidos) (Tabela 22) codificam transportadores de pequenas moléculas (Tabela 24). Adicionalmente, 10,8 % do total de genes em t_{30} com funções conhecidas (31 genes – 29 super-expressos e 2 reprimidos) (Tabela 21) e 8,9 % (59 genes – 47 ativados e 12 reprimidos) em t_{48} (Tabela 21) codificam proteínas relacionadas com o metabolismo energético (Tabela 25). Em adição, 6,3 % (18 genes - 6 super-expressos e 12 reprimidos) dos genes com função conhecida em t_{30} (Tabela 21), e 8,7 % (58 genes – 22 super-expressos e 36 reprimidos) em t_{48} (Tabela 22) codificam reguladores transcricionais (Tabela 26).

TABELA 24 – GENES QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE PEQUENAS MOLÉCULAS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Transporte de pequenas moléculas (genes) reprimidos com 30 horas de cultivo			
PA1493	<i>cysP</i>	2,1	proteína sulfato ligante de transportador tipo ABC
PA1922		29,7	provável receptor TonB-dependente
PA2435		2,1	provável ATPase tipo-P transportadora de cátion
PA2493	<i>mexE</i>	2,1	transportador de efluxo de multidrogas
PA2494	<i>mexF</i>	3,0	transportador de efluxo de multidrogas
PA2495	<i>oprN</i>	3,1	precursor de proteína externa de membrana
PA2911		4,8	provável receptor TonB-dependente
PA2912		3,7	provável componente ATP-ligante de transp. do tipo ABC
PA2913		3,7	proteína hipotética
PA2914		2,8	provável permease transportador do tipo ABC
PA3038		2,1	provável porina

TABELA 24 – GENES QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE PEQUENAS MOLÉCULAS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Transporte de pequenas moléculas (genes) reprimidos com 30 horas de cultivo			
PA3234		2,7	provável transportador de sódio - simporte
PA3407	<i>hasAp</i>	2,6	proteína de aquisição de heme
PA3408	<i>hasR</i>	2,8	proteína de aquisição de heme
PA3888		2,6	provável permease transportador do tipo ABC
PA3889		2,3	provável componente ligante de proteína de transportador tipo ABC
PA3890		2,1	provável permease transportador do tipo ABC
PA4064		20,1	provável componente ATP-ligante de transp. tipo ABC
PA5070	<i>tatC</i>	2,0	proteína de transporte
PA5217		2,2	provável componente ligante de proteína de transportador tipo ABC
PA5500	<i>znuC</i>	8,8	proteína de transporte de zinco
PA5501	<i>znuB</i>	5,5	permease de transportador de zinco ZnuB tipo ABC
Transporte de pequenas moléculas (genes) super-expressos com 30 horas de cultivo			
PA0295		2,0	provável proteína periplasmática ligante de poliamina
PA1183	<i>dctA</i>	9,0	proteína transportadora C4-dicarboxilato
PA1475	<i>ccmA</i>	2,1	proteína exportadora de heme
PA1549		2,1	provável ATPase tipo-P de transporte de cátion
PA2068		3,8	provável transportador MFS
PA3019		2,2	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA3336		2,7	provável transportador MFS
PA3447		2,1	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA3448		2,1	provável permease de transportador tipo ABC
PA3690		7,6	provável ATPase tipo-P de transporte de metal
PA4192		2,1	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA5159		2,0	proteína de resistência multidrogas
PA5231		2,1	provável ATP ligante/ permease de fusão de transportador tipo ABC
PA5287	<i>amtB</i>	2,2	transportador de amônio
Transporte de pequenas moléculas (genes) reprimidos com 48 horas de cultivo			
PA0185		2,3	provável permease de transportador tipo ABC
PA0186		6,2	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA0197		19,5	proteína hipotética
PA0198	<i>exbB1</i>	18,0	proteína de transporte
PA0199	<i>exbD1</i>	7,2	proteína de transporte
PA0280	<i>cysA</i>	5,6	proteína de transporte de sulfato
PA0281	<i>cysW</i>	8,8	proteína de transporte de sulfato
PA0282	<i>cysT</i>	4,7	proteína de transporte de sulfato
PA0283	<i>sbp</i>	9,3	precursor de proteína sulfato-ligante
PA0470		3,3	provável receptor sideróforo do tipo-hidroamato
PA0929		3,6	regulador de resposta de sistema dois componentes
PA1302		2,7	provável precursor de proteína de utilização de heme

TABELA 24 – GENES QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE PEQUENAS MOLÉCULAS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Transporte de pequenas moléculas (genes) reprimidos com 48 horas de cultivo			
PA1493	<i>cysP</i>	3,0	proteína ligante de sulfato de transportador tipo ABC
PA1910		2,2	provável receptor TonB-dependente
PA1922		13,5	provável receptor TonB-dependente
PA1971	<i>braZ</i>	2,1	transportador de aminoácidos de cadeia ramificada
PA2092		5,6	provável transportador MFS
PA2204		6,0	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA2307		4,4	provável permease de transportador tipo ABC
PA2308		7,6	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA2327		2,5	provável permease de transportador tipo ABC
PA2329		2,1	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA2390		5,6	provável ATP ligante/ permease de fusão de transportador ABC
PA2391		6,0	provável proteína externa de membrana
PA2397	<i>pvdE</i>	4,8	proteína de biossíntese de pioverdina
PA2398	<i>fpvA</i>	2,8	receptor ferripioverdina
PA2435		2,5	provável ATPase tipo-P de transporte de cátions
PA2466		2,0	provável receptor TonB-dependente
PA2911		3,5	provável receptor TonB-dependente
PA2912		4,5	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA2913		4,0	proteína hipotética
PA3407	<i>hasAp</i>	17,5	proteína de aquisição de heme
PA3408	<i>hasR</i>	7,7	proteína de aquisição de heme
PA3441		26,0	provável proteína molibdopterin-ligante
PA3442		14,3	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA3443		16,8	provável permease de transportador tipo ABC
PA3447		7,4	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA3448		6,0	provável permease de transportador tipo ABC
PA3749		2,1	provável transportador MFS
PA3790	<i>oprC</i>	3,0	proteína externa de membrana
PA3936		26,2	provável permease de transportador tipo ABC
PA3937		30,6	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC de taurina
PA3938		58,2	provável precursor de proteína periplasmática taurina-ligante
PA4064		15,9	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4156		7,4	provável receptor TonB-dependente
PA4158	<i>fepC</i>	2,2	proteína de transporte ferrico enterobactin

TABELA 24 – GENES QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE PEQUENAS MOLÉCULAS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Transporte de pequenas moléculas (genes) reprimidos com 48 horas de cultivo			
PA4159	<i>fepB</i>	2,9	precursor de proteína periplasmática ferrienterobactin-ligante
PA4160	<i>fepD</i>	2,5	proteína de transporte ferrico enterobactin
PA4168		4,8	provável receptor TonB-dependente
PA4192		2,4	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4193		2,0	provável permease de transportador tipo ABC
PA4195		10,0	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4218		2,5	provável transportador
PA4358		2,5	provável proteína de transporte de ferro (ferroso)
PA4710		2,6	provável receptor de hemin de membrana externa
PA5021		2,2	provável transportador de sódio/hidrogênio - antiporte
PA5030		2,7	provável transportador MFS
PA5500	<i>znuC</i>	7,9	proteína de transporte de zinco
PA5501	<i>znuB</i>	6,0	permease de transportador de zinco do tipo ABC
PA5503		3,9	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA5504		3,5	provável permease de transportador tipo ABC
Transporte de pequenas moléculas (genes) super-expressos com 48 horas de cultivo			
PA0103		3,7	provável transportador de sulfato
PA0136		16,7	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA0137		15,4	provável permease de transportador tipo ABC
PA0138		7,3	provável permease de transportador tipo ABC
PA0166		4,8	provável transportador
PA0325		2,1	provável permease de transportador tipo ABC
PA0326		5,5	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA0438	<i>codB</i>	2,2	permease de citosina
PA0443		9,3	provável transportador
PA0476		2,4	permease
PA0603		5,1	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA0604		2,6	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA0605		2,7	provável permease de transportador tipo ABC
PA0811		2,3	provável transportador MFS
PA0866	<i>aroP2</i>	2,0	proteína de transporte de aminoácidos aromáticos
PA0958	<i>oprD</i>	2,6	proteína externa de membrana (porina)
PA1507		2,9	provável transportador
PA1783	<i>nasA</i>	4,2	transportador de nitrato
PA2006		9,2	provável transportador MFS
PA2068		4,8	provável transportador MFS

TABELA 24 – GENES QUE CODIFICAM TRANSPORTADORES DE PEQUENAS MOLÉCULAS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Transporte de pequenas moléculas (genes) super-expressos com 48 horas de cultivo			
PA2135		2,6	provável transportador
PA3039		2,7	provável transportador
PA3234		3,5	provável transportador de sódio:soluto simporte
PA3236		3,2	provável precursor de proteína glicina betaina-ligante
PA3252		3,0	provável permease de transportador tipo ABC
PA3253		2,6	provável permease de transportador tipo ABC
PA3254		4,0	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA3690		5,7	provável ATPase tipo-P de transporte de metal
PA4023		3,2	provável proteína de transporte
PA4496		2,3	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4497		2,2	provável componente proteína-ligante de transportador tipo ABC
PA4500		5,1	provável componente proteína-ligante de transportador tipo ABC
PA4501		2,8	provável porina
PA4502		2,3	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4503		2,2	provável permease de transportador tipo ABC
PA4504		3,9	provável permease de transportador tipo ABC
PA4505		2,6	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4506		4,3	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4859		13,6	provável permease de transportador tipo ABC
PA4860		27,3	provável permease de transportador tipo ABC
PA4861		26,4	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4862		21,0	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4909		2,7	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4910		4,7	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA4912		2,7	provável permease de aminoácido de cadeia ramificada do tipo ABC
PA4913		5,0	provável componente proteína-ligante de transportador tipo ABC
PA5074		2,0	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA5152		2,0	provável componente ATP-ligante de transportador tipo ABC
PA5153		2,7	provável proteína ligante periplasmática
PA5170	<i>arcD</i>	4,9	transportador arginina/ornitina antiporte
PA5287	<i>amtB</i>	13,8	transportador de amônio

TABELA 25 – GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Metabolismo energético (genes) reprimidos com 30 horas de cultivo			
PA2250	<i>lpdV</i>	2,6	lipoamida desidrogenase
PA2714		2,3	provável molibdopterina oxidoreductase
Metabolismo energético (genes) super-expressos com 30 horas de cultivo			
PA0515		2,1	provável regulador transcricional
PA0519	<i>nirS</i>	2,6	precursor de nitrato redutase
PA1173	<i>napB</i>	2,4	proteína precursora de citocromo tipo-c
PA1174	<i>napA</i>	2,7	proteína nitrato redutase periplasmática
PA1479	<i>ccmE</i>	2,4	proteína de biogênese de citocromo tipo-c
PA1483	<i>cycH</i>	2,4	proteína de biogênese de citocromo tipo-c
PA1551		2,0	provável ferredoxina
PA1553		2,4	provável subunidade oxidase de citocromo c
PA1555		4,8	provável citocromo c
PA1556		6,0	provável subunidade oxidase de citocromo c
PA1557		3,7	provável subunidade oxidase de citocromo (tipo-cbb3)
PA2321		2,4	glucoquinase
PA2638	<i>nuoB</i>	2,2	cadeia B de NADH desidrogenase
PA2639	<i>nuoD</i>	2,6	cadeia C,D de NADH desidrogenase
PA2640	<i>nuoE</i>	2,5	cadeia E de NADH desidrogenase
PA2641	<i>nuoF</i>	2,4	cadeia F de NADH desidrogenase
PA2642	<i>nuoG</i>	2,4	cadeia G de NADH desidrogenase
PA2644	<i>nuoI</i>	2,2	cadeia I de NADH desidrogenase
PA2645	<i>nuoJ</i>	2,2	cadeia J de NADH desidrogenase
PA2647	<i>nouL</i>	2,0	cadeia L de NADH desidrogenase
PA3621	<i>fdxA</i>	2,1	ferredoxina I
PA4333		3,4	provável fumarase
PA4429		2,9	provável precursor citocromo c1
PA4430		2,8	provável citocromo b
PA4587	<i>ccpR</i>	5,8	precursor de peroxidase de citocromo c551
PA4811	<i>fdnH</i>	2,4	subunidade beta de formato desidrogenase nitrato-induzida
PA4812	<i>fdnG</i>	2,9	formato desidrogenase-O, subunidade maior
PA5427	<i>adhA</i>	2,7	alcool desidrogenase
PA5553	<i>atpC</i>	2,1	cadeia epsilon de ATP sintase
Metabolismo energético (genes) reprimidos com 48 horas de cultivo			
PA3183	<i>zwf</i>	2,2	glucose-6-fosfato-1-desidrogenase
PA2995	<i>nqrE</i>	2,2	subunidade Nqr5 de (Na ⁺ translocase) NADH:quinona oxidoreductase
PA2994	<i>nqrF</i>	2,2	subunidade Nqr6 de (Na ⁺ translocase) NADH:quinona oxidor.
PA1400		2,3	provável piruvato descarboxilase
PA3930	<i>cioA</i>	2,6	oxidase cianido terminal insensitivo
PA3397	<i>fpr</i>	2,7	ferredoxina NADP ⁺ redutase
PA1321	<i>cyoE</i>	2,7	proteína CyoE - citocromo o ubiquinol oxidase
PA1317	<i>cyoA</i>	2,7	subunidade II - citocromo o ubiquinol oxidase
PA1320	<i>cyoD</i>	2,7	subunidade IV - citocromo o ubiquinol oxidase
PA1319	<i>cyoC</i>	2,9	subunidade III - citocromo o ubiquinol oxidase
PA2714		3,4	provável molibdopterina oxidoreductase
PA4470	<i>fumC1</i>	6,0	fumarato hidratase

TABELA 25 – GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Metabolismo energético (genes) super-expressos com 48 horas de cultivo			
PA2516	<i>xyzZ</i>	2,0	componente de transferência de elétron toluato 1,2-deoxigenase
PA1581	<i>sdhC</i>	2,0	succinato desidrogenase (subunidade C) provável componente E1 de piruvato desidrogenase, cadeia beta
PA3416		2,1	
PA1582	<i>sdhD</i>	2,1	succinato desidrogenase (subunidade D)
PA3415		2,2	provável diidrolipoamida acetiltransferase
PA0794		2,2	provável aconitato hidratase
PA1787	<i>acnB</i>	2,2	aconitato hidratase 2
PA4640	<i>mgoB</i>	2,3	malato:quinona oxidoreductase
PA1172	<i>napC</i>	2,4	proteína NapC citocromo tipo-c
PA4587	<i>ccpR</i>	2,6	precursor citocromo c551 peroxidase
PA0515		2,6	provável regulador transcricional
PA0113		2,6	provável fator de montagem citocromo c oxidase
PA1553		2,7	provável subunidade oxidase de citocromo c
PA4429		2,8	provável precursor citocromo c1
PA5427	<i>adhA</i>	2,8	alcool desidrogenase
PA2637	<i>nuoA</i>	2,9	cadeia A de NADH desidrogenase I
PA0519	<i>nirS</i>	2,9	precursor nitrito redutase
PA1583	<i>sdhA</i>	3,1	succinato desidrogenase (subunidade A)
PA1580	<i>gltA</i>	3,4	citrato sintase
PA2153	<i>glgB</i>	3,7	enzima 1,4-alfa-glucano ramificada
PA4333		3,9	provável fumarase
PA1557		4,0	provável subunidade citocromo oxidase (cbb3)
PA0108	<i>collI</i>	4,0	subunidade III citocromo c oxidase
PA0105	<i>coxB</i>	4,2	subunidade II citocromo c oxidase
PA2165		4,3	provável glicogênio sintase
PA1173	<i>napB</i>	4,6	proteína precursora NapB citocromo tipo-c
PA4430		4,7	provável citocromo b
PA0106	<i>coxA</i>	4,8	subunidade I, citocromo c oxidase
PA2643	<i>nuoH</i>	4,8	cadeia H de NADH desidrogenase I
PA2638	<i>nuoB</i>	4,9	cadeia B de NADH desidrogenase I
PA2641	<i>nuoF</i>	4,9	cadeia F de NADH desidrogenase I
PA2649	<i>nuoN</i>	4,9	cadeia N de NADH desidrogenase I
PA1174	<i>napA</i>	5,2	proteína NapA, nitrato redutase periplasmática
PA2646	<i>nuoK</i>	5,3	cadeia K de NADH desidrogenase I
PA0107		5,4	proteína hipotética conservada
PA2647	<i>nuoL</i>	5,6	cadeia L de NADH desidrogenase I
PA2644	<i>nuoI</i>	5,6	cadeia I de NADH desidrogenase I
PA1555		5,9	provável citocromo b
PA4810	<i>fdnI</i>	5,9	subunidade gama, formato desidrogenase nitrato-induzível
PA2648	<i>nuoM</i>	6,0	cadeia M de NADH desidrogenase I
PA2645	<i>nuoJ</i>	6,2	cadeia J de NADH desidrogenase I
PA2642	<i>nuoG</i>	6,2	cadeia G de NADH desidrogenase I
PA2640	<i>nuoE</i>	6,4	cadeia E de NADH desidrogenase I
PA2639	<i>nuoD</i>	7,3	cadeia C,D de NADH desidrogenase I
PA1556		8,1	provável subunidade, citocromo oxidase
PA4811	<i>fdnH</i>	9,5	subunidade beta, formato desidrogenase nitrato-induzida
PA4812	<i>fdnG</i>	14,4	formato desidrogenase-o, subunidade maior

TABELA 26 – GENES QUE CODIFICAM REGULADORES TRANSCRICIONAIS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Reguladores transcricionais (genes) reprimidos com 30 horas de cultivo			
PA0477		2,0	provável regulador transcricional
PA0764	<i>mucB</i>	2,1	regulador negativo de alginato biossíntese
PA1179	<i>phoP</i>	2,0	regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA1526		2,2	provável regulador transcricional
PA1911		2,2	provável sensor transmembrana
PA2312		3,2	provável regulador transcricional
PA2359		2,6	provável regulador transcricional
PA3409		2,1	provável sensor transmembrana
PA3599		2,2	provável regulador transcricional
PA3922		3,6	proteína hipotética conservada
PA4776		2,9	regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA5499	<i>np20</i>	4,0	regulador transcricional
Reguladores transcricionais (genes) super-expressos com 30 horas de cultivo			
PA0175		2,2	provável metiltransferase proteína de quimiotaxia
PA0515		2,1	provável regulador transcricional
PA0610	<i>prtN</i>	2,2	regulador transcricional
PA2551		2,0	provável regulador transcricional
PA4853	<i>fis</i>	2,1	proteína DNA-ligante
PA5157		3,0	provável regulador transcricional
Reguladores transcricionais (genes) reprimidos com 48 horas de cultivo			
PA0149		5,1	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA0150		4,7	provável sensor transmembrana
PA0191		23,1	provável regulador transcricional
PA0471		3,0	provável sensor transmembrana
PA0472		2,9	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA0547		3,4	provável regulador transcricional
PA0652	<i>vfr</i>	2,1	regulador transcricional
PA0707	<i>toxR</i>	3,1	provável regulador transcricional
PA0780		2,2	provável regulador transcricional
PA0839		4,0	provável regulador transcricional
PA1179	<i>phoP</i>	3,3	provável regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA1300		8,4	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA1301		7,1	provável sensor transmembrana
PA1713	<i>exsA</i>	2,7	provável regulador transcricional
PA1911		4,9	provável sensor transmembrana
PA1912		6,4	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA2050		5,7	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA2051		2,1	provável sensor transmembrana
PA2093		2,7	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA2299		2,9	provável regulador transcricional
PA2312		24,6	provável regulador transcricional
PA2334		6,3	provável regulador transcricional
PA2359		43,7	provável regulador transcricional
PA2426	<i>pvdS</i>	2,0	fator sigma
PA246		2,0	provável sensor transmembrana
PA2468		2,8	provável fator sigma-70, subfamíliaECF

TABELA 26 – GENES QUE CODIFICAM REGULADORES TRANSCRICIONAIS QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Reguladores transcricionais (genes) reprimidos com 48 horas de cultivo			
PA2686	<i>pfeR</i>	3,6	provável regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA3006		2,8	provável regulador transcricional
PA3398		2,4	provável regulador transcricional
PA3409		3,8	provável sensor transmembrana
PA3410		3,5	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA3721		5,7	provável regulador transcricional
PA3899		5,8	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA3900		4,5	provável sensor transmembrana
PA3932		14,2	provável regulador transcricional
PA4227		<i>pchR</i>	2,3
PA4776	2,4		provável regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA4895		13,6	provável sensor transmembrana
PA4896		7,3	provável fator sigma-70, subfamíliaECF
PA5499	<i>np20</i>	4,7	provável regulador transcricional
Reguladores transcricionais (genes) super-expressos com 48 horas de cultivo			
PA0175		5,5	provável metiltransferase proteína de quimiotaxia
PA0236		3,1	provável regulador transcricional
PA0527	<i>dnr</i>	2,1	regulador transcricional
PA0873		<i>phhR</i>	2,3
PA0876			3,0
PA1853		2,3	provável regulador transcricional
PA1978		2,9	provável regulador transcricional
PA1980		2,4	provável regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA2010		8,7	provável regulador transcricional
PA2016		2,1	provável regulador transcricional
PA2032		2,2	provável regulador transcricional
PA2511		24,3	provável regulador transcricional
PA2519	<i>xylS</i>	2,6	regulador transcricional
PA2704			3,7
PA3174		3,7	provável regulador transcricional
PA4296		3,4	provável regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA4341		3,3	provável regulador transcricional
PA4787		2,6	provável regulador transcricional
PA5125	<i>ntrC</i>	5,8	provável regulador de resposta de sistema dois-componentes
PA5380			11,4
PA5525		2,2	provável regulador transcricional

Um grande número de genes que codificam proteínas relacionadas com a biossíntese e metabolismo de aminoácidos também apresentou alterações nos perfis de transcrição respondendo ao caseinato de sódio (Figura 19 e Tabela 27). Quase 10 % dos genes com funções conhecidas em t_{30} (28 genes, 12 ativados e 16 reprimidos, Tabela 21) e 5,4 % em t_{48} (36 genes, 21 ativados e 15 reprimidos, Tabela 22) codificam para enzimas envolvidas na biossíntese e metabolismo de aminoácidos (Tabela 27). Entre estes genes encontra-se *gdhA*, gene que codifica a glutamato desidrogenase, enzima envolvida na degradação do glutamato e conseqüente formação de succinato (VALLEA *et al.*, 1984). O fato de este gene estar super-expresso com 30 horas de cultivo e reprimido com 48 horas de cultivo (Tabela 27) pode estar relacionado com a proporção de ácido glutâmico na composição da caseína (mais de 25 % m/m). Em outras palavras, uma vez hidrolisada a proteína, uma grande quantidade de glutamato vai estar disponível. Outros genes que indiretamente estão relacionados ao metabolismo do glutamato e que apresentaram transcrição ativada na presença de caseinato de sódio em t_{30} foram: 1) a proteína transportadora C4-dicarboxilase (codificada pelo gene PA1183) (Tabela 27), responsável pelo simporte de compostos dicarboxilados, tais como succinato, malato e fumarato (LEWENZA *et al.*, 2005); e 2) a adenilsuccinato liase (codificada pelo gene PA2629) (Tabela 27), enzima relacionada com a biossíntese de nucleotídeos (purinas), onde catalisa a conversão de succinato a fumarato (HE; SMITH; ZALKING, 1992). Dado a grande proporção de glutamato na caseína, o aumento da expressão de genes direta (*gdhA*) ou indiretamente (PA1183 e PA2629) relacionados com degradação do glutamato provavelmente esteja relacionado com a degradação e consumo da caseína, cuja intensidade possivelmente tenha sido maior com 30 horas de cultivo.

PA2943, que codifica a enzima fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolase também foi promovido em t_{30} . Esta enzima está relacionada com a biossíntese de corismato, precursor da biossíntese das fenazinas (RAMILO; EVANS *et al.*, 1997). Os genes relacionados com a biossíntese das fenazinas (PA4210, PA4211, PA1901, PA1902, PA1903, PA1904, PA1905) (*Pseudomonas* Data base - www.pseudomonas.com) também foram super-expressos em t_{30} . A alta porcentagem de glutamato na caseína pode, também, estar relacionada com esta

TABELA 27 - GENES QUE CODIFICAM PARA BIODISSÍNTese E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Aminoácidos biossintese e metabolismo (genes) reprimidos com 30 horas de cultivo			
PA0316	<i>serA</i>	2,6	D-3-fosfoglicerato desidrogenase
PA0896	<i>aruF</i>	2,2	subunidade AI, arginina/ornitina succiniltransferase
PA0899	<i>aruB</i>	2,1	succinilarginina dihidrolase
PA1002	<i>phnB</i>	2,4	componente II, antranilato sintase
PA1818		2,1	provável ornitina/arginina/lisina descarboxilase
PA1843	<i>metH</i>	2,8	metionina sintase
PA1927	<i>metE</i>	11,0	5-metiltetraidropteroiltriglutamato-homocisteina S-metiltransferase
PA2247	<i>bkdA1</i>	3,1	2-oxoisovalerato desidrogenase (subunidade alfa)
PA2248	<i>bkdA2</i>	2,8	2-oxoisovalerato desidrogenase (subunidade beta)
PA2250	<i>lpdV</i>	2,6	lipoamida dehidrogenase-Val
PA2444	<i>glyA2</i>	2,3	serina hidroximetiltransferase
PA2445	<i>gcvP2</i>	2,7	proteína sistema P2, glicina clivagem
PA2446	<i>gcvH2</i>	2,6	proteína sistema H2, glicina clivagem
PA2531		2,2	provável aminotransferase
PA5302	<i>dadX</i>	2,1	racemase alanino catabólica
PA5429	<i>aspA</i>	2,3	aspartato amônia-liase
Aminoácidos biossintese e metabolismo (genes) super-expressos com 30 horas de cultivo			
PA2084		2,2	provável asparagina sintase
PA2629	<i>purB</i>	2,5	adenilosuccinato liase
PA2943		8,4	fosfo-2-deidro-3-deoxiheptonato aldolase
PA3116		2,0	provável aspartato-semialdeido desidrogenase
PA3475	<i>pheC</i>	2,8	precursor ciclohexadienil desidratase
PA4138	<i>tyrS</i>	6,0	tirosil-tRNA sintase
PA4442	<i>cysN</i>	2,1	ATP sulfúrilase GTP-ligante, subunidade APS quinase
PA4448	<i>hisD</i>	2,0	histidinol desidrogenase
PA4519		2,4	provável ornitina descarboxilase
PA4548		2,1	provável D-amino ácido oxidase
PA4588	<i>gdhA</i>	2,2	glutamato desidrogenase
PA4759	<i>dapB</i>	2,4	diidrodipicolinato redutase
Aminoácidos biossintese e metabolismo (genes) reprimidos com 48 horas de cultivo			
PA0316	<i>serA</i>	4,4	D-3-fosfoglicerato desidrogenase
PA0430	<i>metF</i>	2,1	5,10-metilenotetraidrofolato redutase
PA0546	<i>metK</i>	2,9	metionina adenosiltransferase
PA0896	<i>aruF</i>	2,2	arginina/ornitina succiniltransferase, subunidade AI
PA1002	<i>phnB</i>	4,1	antranilato sintase, componente II
PA1162	<i>dapE</i>	2,2	succinil-diaminopimelato desuccinilase
PA1843	<i>metH</i>	3,6	metionina sintase
PA1927	<i>metE</i>	125,2	5-metiltetraidropteroiltriglutamato-homocisteina S-metiltransferase
PA2084		4,0	provável asparagina sintase
PA2446	<i>gcvH2</i>	2,4	proteína de sistema H2, glicina clivagem
PA2531		4,2	provável aminotransferase
PA3151	<i>hisF2</i>	2,0	imidazoleglicerol-fosfato sintase, subunidade ciclase
PA3165	<i>hisC2</i>	2,4	histidinol-fosfato aminotransferase
PA4588	<i>gdhA</i>	9,1	glutamato desidrogenase
PA4602	<i>glyA3</i>	2,7	serino hidroximetiltransferase

TABELA 27 - GENES QUE CODIFICAM PARA BIOSSÍNTESE E METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E QUE RESPONDERAM A SUPLEMENTAÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO NO MEIO DE CULTIVO (continuação)

ORF	Gene	Razão condição	Descrição da proteína
Aminoácidos biossintese e metabolismo (genes) super-expressos com 48 horas de cultivo			
PA0865	<i>hpd</i>	96,5	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase
PA0870	<i>phhC</i>	2,9	aminoácido aromático aminotransferase
PA0871	<i>phhB</i>	3,7	pterin-4-alfa-carbinolamina desidratase
PA0872	<i>phhA</i>	6,7	fenilalanina-4-hidroxilase
PA1337	<i>ansB</i>	2,4	glutaminase-asparaginase
PA1999		53,9	provável CoA transferase, subunidade A
PA2000		39,6	provável CoA transferase, subunidade B
PA2247	<i>bkdA1</i>	4,0	2-oxoisovalerato desidrogenase (subunidade alfa)
PA2248	<i>bkdA2</i>	3,0	2-oxoisovalerato desidrogenase (subunidade beta)
PA3475	<i>pheC</i>	2,7	precursor cicloexadienil desidratase
PA3570	<i>mmsA</i>	6,7	metilmalonato-semialdeido desidrogenase
PA3658	<i>glnD</i>	2,6	proteína-PII uridililtransferase
PA4519		2,1	provável ornitina decarboxilase
PA5098	<i>hutH</i>	2,6	histidina amonia liase
PA5100	<i>hutU</i>	8,5	urocanase
PA5119	<i>glnA</i>	4,2	glutamina sintase
PA5170	<i>arcD</i>	4,9	transportador arginina/ornitina, antiporte
PA5171	<i>arcA</i>	3,8	arginina deaminase
PA5172	<i>arcB</i>	4,2	ornitina carbamoiltransferase, catabolico
PA5173	<i>arcC</i>	3,0	carbamato quinase
PA5415	<i>glyA1</i>	2,2	serina hidroximetiltransferase

seqüência de fatos, uma vez que este aminoácido é um precursor da biossintese das fenazinas.

PA2084, que codifica asparagina sintetase - enzima que catalisa a conversão de ácido aspártico para asparagina (FORSYTHE; KARP; MAVROVOUNIOTIS, 1997), também foi super-expresso com 30 horas de cultivo (Tabela 27). Uma possível justificativa para este fato pode ser, novamente, a composição da caseína, uma vez que altas proporções (mais de 13 %, m/m) de ácido aspártico são encontradas nesta proteína. O fato de PA2084 estar super-expresso apenas com 30 horas de cultivo provavelmente esteja então relacionado com a degradação e consumo da caseína. O que se nota, com estes resultados, é que a composição da caseína pode influenciar a transcrição de genes relacionados com o metabolismo dos aminoácidos produtos de sua degradação, assim como a biossintese de metabólitos que utilizam como precursores os aminoácidos ou produtos de degradação destes aminoácidos que a compõe.

5.14.6 Efeito da suplementação de caseinato de sódio no meio de cultivo na biossíntese de ramnolipídeos e na expressão dos genes do sistema *quorum sensing*

Como relatado na revisão bibliográfica, o sistema QS de *P. aeruginosa* é formado por dois circuitos (LasI-LasR e RhII-RhIR). Neste sistema, existem duas moléculas sinalizadoras do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL): N-(3-oxododecanoil)-HSL e N-butilil-HSL, produzidas pelas enzimas LasI e RhII, respectivamente. As moléculas de acil-HSL ligam-se aos relativos fatores de transcrição (LasR e RhIR), ativando a expressão dos genes alvos (SCHUSTER; GREENBERG, 2006; GILBERT *et al.*, 2009). No presente trabalho, a transcrição dos genes do circuito RhII-RhIR foi ativada na presença de caseinato de sódio, tanto com 30 horas de cultivo (1,6- e 1,3-vezes, respectivamente) quanto com 48 horas de cultivo (2,5- e 1,2- vezes, respectivamente). Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Sandoz *et al.* (2007), que também mostraram uma ativação dos genes que compõe o circuito RhII-RhIR utilizando caseinato de sódio como fonte de carbono no meio de cultivo. Estes autores obtiveram um aumento nos níveis transcricionais de *rhIR* e *rhII* de 3 a 5-vezes (utilizando PCR quantitativo e expressando os resultados em picogramas de DNA genômico) com o uso de caseinato de sódio no meio de cultivo como única fonte de carbono, em relação ao uso de casamino ácidos (SANDOZ *et al.*, 2007). A adição de caseinato de sódio no meio, no presente trabalho, não influenciou a expressão dos genes do circuito LasI-LasR (<1,2 vezes). O mesmo ocorreu com Sandoz *et al.* (2007); segundo estes autores a expressão gênica basal do circuito LasI-LasR já é suficiente para a completa indução da maior parte dos genes regulados pelo sistema QS.

A transcrição dos genes *rhIA*, *rhIB* (ramnosiltransferase 1) e *rhIC* (ramnosiltransferase 2) foi promovida pela presença de caseinato de sódio no meio de cultivo em t_{30} (1,6-, 1,8- e 1,4-vezes, respectivamente) e em t_{48} (1,5-, 1,5- e 1,2-vezes, respectivamente). A regulação positiva da expressão das ramnosiltransferases pode ser explicada pela super-expressão dos genes que compõe o circuito RhII-RhIR [item 2.4.1 (Revisão Bibliográfica)]. A super-expressão

das ramnosiltransferases também foi encontrada nos resultados de estudos de genes modulados pelo sistema QS, feitos através da análise de transcriptomas de *P. aeruginosa* (SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003; HENTZER *et al.*, 2003). Adicionalmente, o incremento na biossíntese dos ramnolipídeos mostra que o maior nível de transcrição destas enzimas provavelmente esteja relacionado com o aumento na produção de ramnolipídeos.

Quanto aos genes *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* e *rmlD* (responsáveis pela biossíntese de ramnose, operon *rhBCAD*), estes também foram ativados com a adição de caseinato de sódio no meio de cultivo tanto em t_{30} (1,8-, 2,1-, 1,8- e 2,0- vezes, respectivamente) como em t_{48} (1,8-, 2,3-, 1,7- e 2,2- vezes, respectivamente). A super-expressão dos genes relacionados com a biossíntese de ramnose também está de acordo com os estudos de modulação da expressão gênica mediado pelo sistema QS feitos a partir da análise do transcriptoma de *P. aeruginosa* (SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003; HENTZER *et al.*, 2003). Uma das estratégias utilizadas em comum nestes estudos foi a de construir cepas mutantes deficientes para a produção das moléculas de acil-HSL (moléculas sinalizadoras do QS). Através de ensaios de hibridização molecular de microarranjos de DNA que utilizaram estas cepas mutantes na presença ou na ausência de acil-HSL exógena, estes autores conseguiram identificar os genes que respondiam diferentemente na presença do sinalizador e que, por conseguinte, apresentariam certo grau de regulação pelo sistema QS. Entre as centenas de genes ativados pelo sistema QS relatados por estes trabalhos, encontram-se os genes do operon *rhBCAD*, assim como os do operon *rhIAB* e o gene *rhIC* citados acima (SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003; HENTZER *et al.*, 2003).

5.14.7 Cinética da expressão dos genes relacionados com a biossíntese de ramnolipídeos

O nível de transcrito depende de um variado grupo de fatores, incluindo as taxas de transcrição e a estabilidade dos transcritos. Assim, neste ponto do trabalho

optou-se por se estudar a cinética da expressão dos genes de *P. aeruginosa* PAO1. Com este propósito, os microarranjos de DNA foram hibridizados com cDNA obtido a partir de RNA de PAO1 derivado do cultivo na condição teste (presença de caseinato de sódio no meio de cultivo), nos tempos de cultivo, 9, 18, 24, 30 e 48 horas (Figura 17). Nestes experimentos avaliou-se diretamente a intensidade de hibridização-normalizada e não uma relação entre duas condições (teste/controle). Os gráficos (Figura 20 e 21) foram gerados pelo software GeneSpring GX 10.0.2 (Agilent Technology), o mesmo software que foi utilizado para as normalizações.

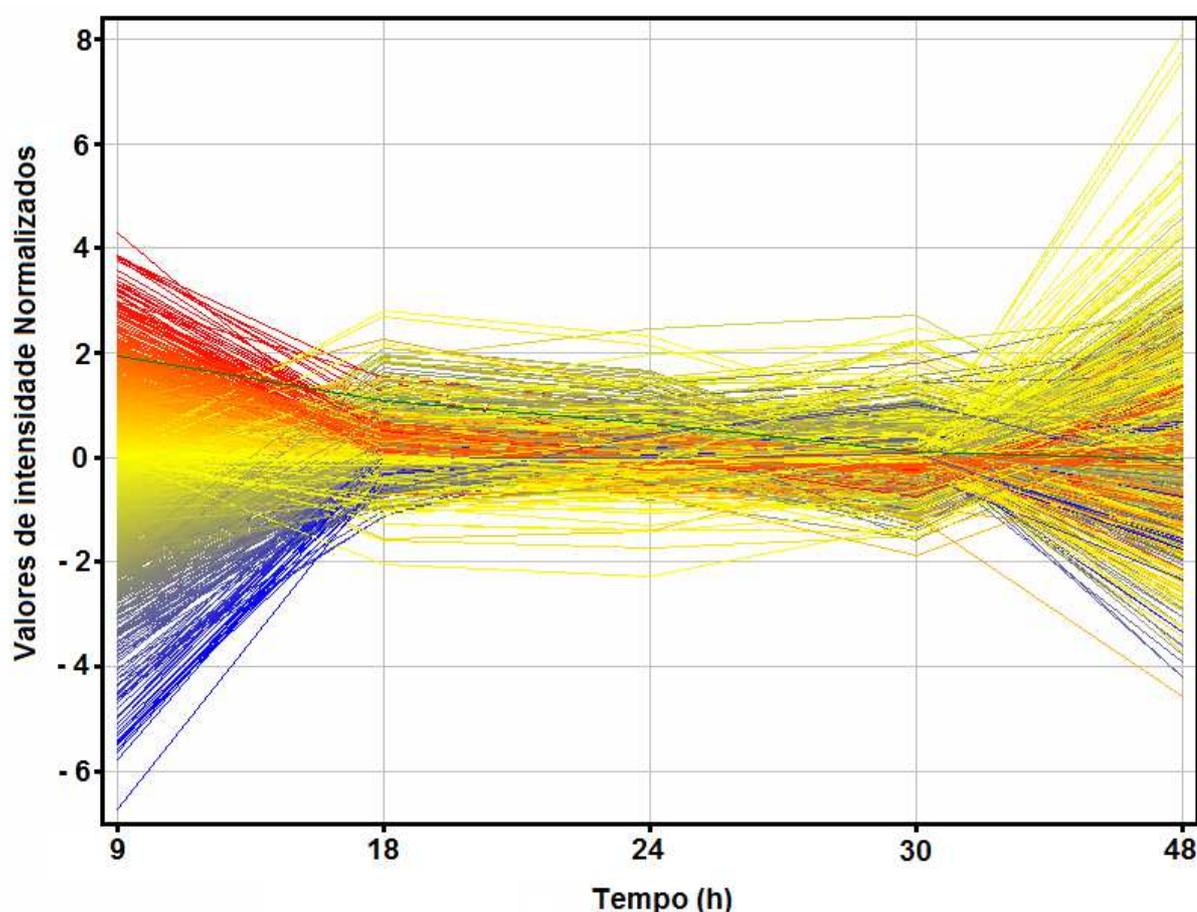


FIGURA 20 – CINÉTICA DO PERFIL TRANSCRICIONAL ABSOLUTO DE *P. aeruginosa* PAO1 DURANTE CRESCIMENTO EM MEIO COM CASEINATO DE SÓDIO

As linhas do gráfico apresentam uma correlação entre a intensidade de hibridização e a escala cores (mínima intensidade de hibridização azul e máxima intensidade de hibridização vermelho) apenas no tempo 9 h. Assim, nos tempos de 18 h a 48 h as cores das linhas não correspondem necessariamente a uma correlação com a intensidade de hibridização

De forma geral, os perfis de expressão entre 18 a 30 horas de cultivo foram muito semelhantes (Figura 20). Por outro lado, entre 9 e 18 horas e entre 30 e 48 horas uma intensa variação pode ser observada (Figura 20). Adicionalmente, avaliou-se a expressão de genes cuja relação com a biossíntese dos ramnolipídeos já havia sido previamente reportada (Figura 21): os genes que codificam as ramnosiltransferases 1 e 2 (operon *rhlAB* e *rhlC*, respectivamente) (RAHIM *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2003); os genes que codificam as proteínas envolvidas na biossíntese *de novo* de ácidos graxos [*fabA*, *fabB*, *fabF1*, *fabF2*, *fabI*, *fabG*, *accC*, *accD* e PA5436 (provável subunidade biotina carboxilase de uma transcarboxilase)] (CAMPOS-GARCIA, *et al.*, 1998; REHM; MITSKY; STEINBÜCHEL, 2001; ZHU; ROCK, 2008; Pseudomonas Genome Database - www.pseudomonas.com); e os genes que codificam o sistema QS, circuitos LasR-LasI e RhlR-RhlI (SCHUSTER; GREENBURG, 2006). Outro gene contemplado neste estudo foi *rhlG*, gene que apresenta um papel controverso na biossíntese dos ramnolipídeos (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998; ZHU; ROCK, 2008).

5.14.7.1 Ramnosiltransferase 1 e 2

Como pode ser visto na Figura 21, os genes *rhlA*, *rhlB* e *rhlC* exibiram níveis de transcrição crescentes, apresentando os máximos níveis de transcrição com 48 h de cultivo. Este resultado está de acordo com o estudo cinético da produção de ramnolipídeos pela PAO1 (Figura 16), que mostrou que em t_{48} a velocidade de produção de ramnolipídeos já é máxima. Este resultado já era esperado, uma vez que a biossíntese de ramnolipídeos é máxima na fase estacionária (OCHSNER; REISER, 1995). Adicionalmente, o fato dos níveis de expressão destes genes serem maiores com 48 horas de cultivo está de acordo com resultados da literatura (SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003; SCHUSTER *et al.*, 2004). Estes trabalhos mostraram que a expressão dos genes do sistema QS e, conseqüentemente, dos genes por eles regulados não depende apenas da presença de altas concentrações das moléculas sinalizadoras, mas também de certa densidade celular (concentração de células) e da expressão de *rpoS* (fator de transcrição de fase estacionária), o que leva algum tempo para ser atingido.

5.14.7.2 Biossíntese *de novo* de ácidos graxos

A porção lipídica dos ramnolipídeos é proveniente da biossíntese *de novo* dos ácidos graxos. Não há indícios que intermediários da beta-oxidação possam ser

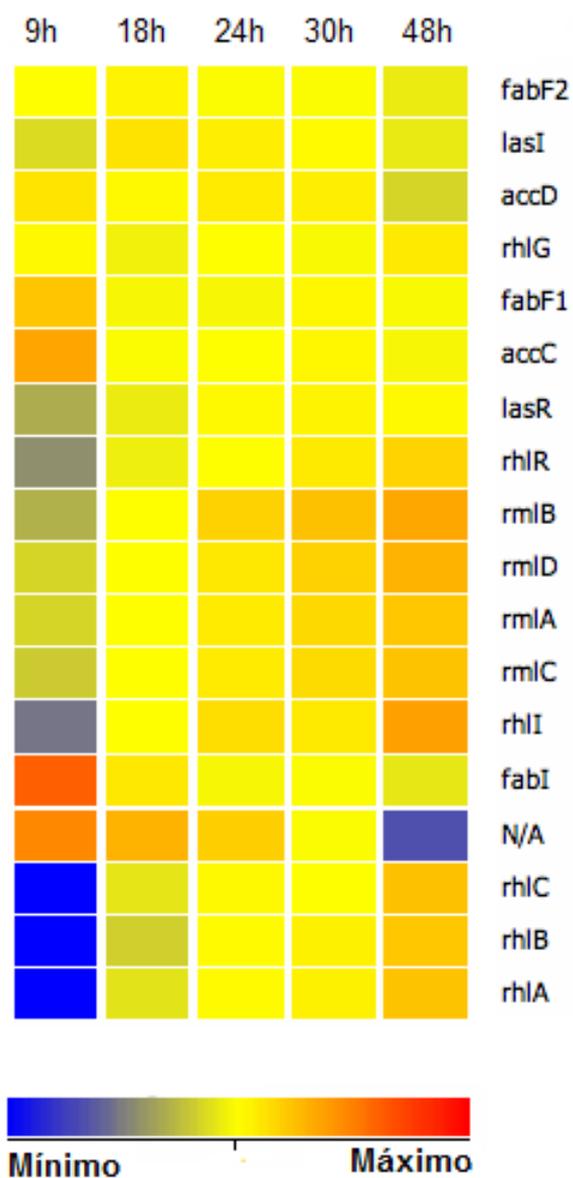


FIGURA 21 – CINÉTICA DO PERFIL TRANSCRICIONAL DOS GENES RELACIONADOS COM A BIOSÍNTESE SE RAMNOLIPÍDEOS POR *P. aeruginosa* PAO1 DURANTE CRESCIMENTO EM MEIO COM CASEINATO DE SÓDIO

N/A: PA5436 (provável subunidade biotina carboxilase de uma transcarboxilase)

utilizados (ZHU; ROCK, 2008). A cinética de expressão dos genes relacionados com a biossíntese *de novo* de ácidos graxos pode ser vista na Figura 21. Esta classe de genes mostrou uma tendência de expressão oposta à apresentada pelos outros grupos de genes relacionados com a biossíntese de ramnolipídeos (ramnosiltransferases, síntese de ramnose e circuito QS). Em outras palavras, os genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos apresentaram maiores níveis de transcrição na fase exponencial de crescimento (Figura 21). O fato de se haver um alto nível de transcrição destes genes no início dos cultivos poderia ser justificado pela necessidade de síntese de ácidos graxos para compor as membranas celulares durante a intensa multiplicação celular. Por outro lado, estes dados geram dúvidas quanto ao papel da biossíntese de ácidos graxos na biossíntese de ramnolipídeos. O argumento utilizado aqui baseia-se em resultados de controle transcricional, e é evidente que existem várias questões que podem influenciar as taxas de biossíntese dos ácidos graxos, como: 1) a estabilidade dos transcritos, 2) a estabilidade das enzimas traduzidas; 3) a cinética dessas enzimas; e 4) a regulação da via como um todo. Em outras palavras, com base em um transcriptoma não é possível se sugerir a possível velocidade de uma via metabólica. No entanto, a biomassa média (0,45 g/L) obtida dos cultivos suplementados com caseinato de sódio foi mais de 20 vezes menor que a massa de ramnolipídeos (9,5 g/L) produzida, em outras palavras, a quantidade de ácidos graxos necessários para síntese dos ramnolipídeos foi bem superior à massa dos lipídeos estruturais. Além do que, os menores níveis de transcrição dos genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos ocorreram na fase estacionária do ciclo de crescimento, quando o nível de biossíntese dos ramnolipídeos é máximo.

5.14.7.3 Sistema *quorum sensing*

A transcrição dos genes que compõe o circuito RhII-RhIR do sistema QS exibiu um perfil de expressão que seguiu a mesma tendência cinética (maiores níveis de transcrição em t_{48}) do perfil de expressão dos genes *rhIA*, *rhIB*, *rhIC*, assim como dos genes *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* e *rmlD*. Este resultado já era esperado, uma vez que estudos do transcriptoma de *P. aeruginosa* mostraram que todos estes genes

são controlados pelo sistema QS (SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003; HENTZER *et al.*, 2003). Adicionalmente, os perfis de expressão de todos estes genes mostraram um maior nível transcricional com 48 horas de cultivo quando a velocidade de produção de ramnolipídeos já é máxima (Figura 16). Este resultado confirma uma parte da hipótese deste estudo, ou seja, que a adição de caseinato de sódio ao meio de cultivo pode estimular a biossíntese de ramnolipídeos baseado na regulação da expressão gênica mediada pelo sistema QS.

5.14.7.4 Função da RhlG na biossíntese dos ramnolipídeos

Assim como o nível transcricional dos genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos, o nível de transcrição de *rhlG* não apresentou modulação à suplementação de caseinato de sódio no meio de cultivo. A função deste gene na biossíntese dos ramnolipídeos ainda é mal definida devido à existência de relatos conflitantes na literatura. Segundo Campos-Garcia *et al* (1998), o gene *rhlG* de *P. aeruginosa* codifica uma β -cetoacil redutase NADPH-dependente que é absolutamente requerida para síntese da porção β -hidroxiácido dos ramnolipídeos (estes pesquisadores basearam-se na perda de produção de ramnolipídeos causada pela deleção de *rhlG*). Por outro lado, a estrutura cristalina e a atividade *in vitro* desta enzima não são compatíveis com a atividade de redutase NADPH-dependente proposta por Campos-Garcia *et al* (1998) (MILLER *et al.*, 2006). Em adição, segundo Zhu e Rock (2008), RhlG não apresenta nenhuma função na síntese dos ramnolipídeos, uma vez que, nos seus experimentos, mutantes com *rhlG* deletados apresentaram os mesmos níveis de produção de ramnolipídeos das correlatas estirpes selvagens. Os resultados apresentados pelo presente trabalho não adicionaram novas informações que possam ajudar na elucidação da possível função de *rhlG* na biossíntese dos ramnolipídeos. Mais estudos serão necessários para melhor definir a importância deste gene na biossíntese de ramnolipídeos.

5.14.8 Considerações sobre o transcriptoma de *P. aeruginosa* PAO1 durante a produção de ramnolipídeos por fermentação submersa utilizando meio suplementado com caseinato de sódio

Este é o primeiro estudo de análise do transcriptoma de *P. aeruginosa* durante a produção de ramnolipídeos e também o primeiro estudo de cinética do perfil de modulação de transcrição dos genes relacionados com a biossíntese dos ramnolipídeos por *P. aeruginosa* (Figuras 20 e 21). Este estudo permitiu a identificação de genes diferencialmente expressos na presença e ausência de caseinato de sódio no meio de cultivo. O estudo mostrou que os genes que codificam o circuito RhII-RhIR do sistema QS, assim como os genes que codificam as ramnosiltransferases 1 e 2 e os genes relacionados com a biossíntese de ramnose apresentaram os níveis de transcrição ativados na presença do caseinato de sódio. Também foi possível identificar intensas modificações na transcrição de genes relacionados a diferentes setores do metabolismo e dos processos celulares básicos da bactéria, como expressão das proteínas de membrana e sistemas de transporte, metabolismo energético, biossíntese e metabolismo de aminoácidos e reguladores transcricionais. A análise conjunta dos resultados obtidos com os estudos de produção de ramnolipídeos, do perfil transcricional diferencial na presença e ausência de caseinato de sódio, e do perfil temporal do transcriptoma de PAO1 indicou que o aumento de mais de 10 vezes na produção de ramnolipídeos provavelmente dependa de três fatores: 1) um aumento no nível transcricional de genes relacionados com a biossíntese de ramnolipídeos; 2) regulação da expressão gênica mediada pelo sistema *quorum sensing*; e 3) um conjunto de alterações metabólico-nutricionais.

6. CONCLUSÕES

6.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES

Neste trabalho comprovou-se que é possível produzir ramnolipídeos por fermentação em estado sólido em concentrações equiparáveis aos resultados obtidos por fermentação submersa. O processo de produção desenvolvido evitou a formação de espuma em escala de bancada e sugere que a produção em grande escala é tecnicamente viável.

As principais conclusões relacionadas a cada etapa foram:

- A produção de ramnolipídeos em biorreator de fermentação submersa foi seriamente prejudicada pela formação de espuma. Este resultado sugere que a produção de ramnolipídeos em biorreator de fermentação submersa só é possível se adotadas medidas de contenção de espuma;
- Uma das contribuições deste trabalho foi o desenvolvimento de técnicas de extração e quantificação de ramnolipídeos produzidos por FES, uma vez que os substratos sólidos utilizados na FES são matrizes complexas que contêm inúmeros componentes que interferem nos métodos de quantificação. Para este propósito a seguinte seqüência de etapas é apropriada: 1) extração aquosa dos ramnolipídeos; 2) extração orgânica [CHCl_3 :Metanol (3:1)]; 3) concentração do extrato orgânico por evaporação do solvente; 4) solubilização do extrato orgânico concentrado em água; e 5) quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico;

- O bagaço de cana-de-açúcar é apropriado para produção de ramnolipídeos, pois é um suporte essencialmente inerte, proporciona níveis de produção razoáveis (8 g/L de solução umedecedora) e grande facilidade de extração do tensoativo, além de ser abundante, disponível e de baixo custo;
- As propriedades tensoativas dos ramnolipídeos produzidos por FES (CMC 46,8 mg/L e E_{24h} superior a 90 % para querosene, gasolina e óleo diesel) são muito semelhantes às obtidas pelos ramnolipídeos produzidos por fermentação submersa. Este resultado sugere que os ramnolipídeos produzidos por FES podem perfeitamente substituir os obtidos por fermentação submersa sem qualquer perda das propriedades tensoativas;
- A determinação das propriedades tensoativas das frações isoladas de mono- e di-ramnolipídicas mostrou que a mistura, ou seja, o extrato bruto, apresenta uma eficiência emulsificante mais consistente contra os hidrocarbonetos testados. Apenas a mistura proporcionou resultados E_{24} superiores a 50 % para todos os hidrocarbonetos testados;
- A termo-estabilidade dos ramnolipídeos observada neste trabalho é um importante resultado, uma vez que mostra que é possível se utilizar métodos de esterilização a quente para tornar o sólido fermentado livre de *P. aeruginosa*, antes dos procedimentos de extração. Assim, em um processo industrial se minimizaria o risco de infecção oportunista em operários;
- Os melhores resultados de produção obtidos com este trabalho foram: 1) 46 g de ramnolipídeos por litro de solução umedecedora, obtido com a mistura de bagaço de cana e farelo de girassol (50 % em massa de cada) umedecida com solução de sais e glicerol (10 %, v/v) como fonte de carbono; e 2) 45 g de ramnolipídeos por litro de solução umedecedora, obtido com a mistura de

bagaço de cana e torta de milho (50 % em massa de cada) umedecida com solução de sais e uma mistura de glicerol (6 %, v/v) e óleo de soja (6 %, v/v) como fonte de carbono. Estes resultados são comparáveis aos melhores resultados de produção obtidos por fermentação submersa, o que comprova o potencial da FES para produção de ramnolipídeos.

6.2. ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE *P. aeruginosa* PAO1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

- Este foi o primeiro estudo de análise do transcriptoma de *P. aeruginosa* durante a produção de ramnolipídeos e também o primeiro estudo de cinética do perfil de expressão gênica relacionado com a biossíntese dos ramnolipídeos. Com este estudo foi possível identificar intensas modificações no nível transcricional de genes relacionados a diferentes setores do metabolismo e dos processos celulares básicos da bactéria, como: expressão de proteínas de membrana e sistemas de transporte; metabolismo energético; biossíntese e metabolismo de aminoácidos; e reguladores transcricionais;
- O estudo do transcriptoma de *P. aeruginosa* durante a biossíntese de ramnolipídeos mostrou que altos níveis de produção deste tensoativo provavelmente estejam vinculados a uma combinação de fatores como, maiores níveis de transcrição dos genes relacionados com a biossíntese de ramnolipídeos, maiores níveis de transcrição de genes do circuito RhII-RhIR e de um conjunto de alterações metabólico-nutricionais do microrganismo.

7. ETAPAS FUTURAS

7.1. CORRELACIONADAS COM O ESTUDO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES

Os estudos de produção de ramnolipídeos por FES permitiram a identificação de pontos a serem explorados para futuros trabalhos em diferentes áreas, tais como:

1) Produção

- Estudos em escala piloto para produção de ramnolipídeos, a iniciar com reatores de bandeja. Este é um reator sem agitação de leito, portanto é o que mais se aproxima da forma que a FES foi conduzida neste trabalho, ou seja em frascos Erlenmeyers. Obviamente que existe o fato de *P. aeruginosa* ser um patógeno oportunista, no entanto a possibilidade de se esterilizar o sólido fermentado antes dos procedimentos de extração minimizariam às possibilidades de infecções oportunista;
- Estudos em reatores de coluna e de respirometria para melhor avaliar a possibilidade de utilização do reator piloto com aeração forçada e leito com agitação intermitente. Através do uso do reator de colunas é possível se avaliar, em uma escala menor e mais facilmente controlável, o efeito da aeração em diferentes profundidades do leito. Assim os resultados gerados por experimentos neste reator podem direcionar os experimentos no reator piloto;

- Estudos de produção em reator piloto com aeração forçada e leito com agitação intermitente. O interesse em se realizar testes em reator piloto é baseado no fato deste grupo de pesquisa ter um reator piloto de aeração forçada, assim como no interesse em aumentar a escala de produção dos ramnolipídeos. Uma vez que, com este trabalho mostrou-se que é possível produzir ramnolipídeos em altas concentrações por FES em frascos Erlenmeyers e que esta tecnologia está padronizada e é muito reprodutível, as fermentações de bancada poderão servir como controles para os experimentos nos reatores.

2) Determinação estrutural

- Estudos de elucidação estrutural e de quantificação das proporções dos congêneres dos ramnolipídeos produzidos por FES nas diferentes condições selecionadas neste trabalho. Como mostrado o poder emulsificante dos di-ramnolipídeos é bem superior quando o hidrocarboneto testado foi a gasolina. Assim, a elucidação estrutural relacionada com diferentes condições de cultivo pode indicar qual é a condição que apresente maior concentração proporcional de di-ramnolipídeos e direcionar qual é o melhor processo para esta aplicação específica.

3) Aplicação

- Estudos de biorremediação de solos e águas contaminadas com compostos de baixa solubilidade, com ênfase no petróleo e seus derivados. Estudos iniciais foram feitos por este grupo e mostraram-se bem promissores. Entretanto, dado o potencial de aplicação dos ramnolipídeos e a grande quantidade de trabalhos na literatura de aplicação de ramnolipídeos produzidos por fermentação submersa, se faz necessário mais estudos de

aplicação de ramnolipídeos produzidos por FES. Assim, será possível fazer comparações um pouco mais aprofundadas entre os ramnolipídeos produzidos pelas duas tecnologias fermentativas;

- Estudos de biorremediação e desenvolvimento de processos com aplicação direta do sólido fermentado em biorremediação. A aplicação do sólido fermentado direto pode ser muito viável, já que dessa forma diminuir-se-á etapas do processo e, por conseguinte o custo.

7.2. CORRELACIONADAS COM ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE *P. aeruginosa* PAO1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O estudo do transcriptoma *P. aeruginosa* PAO1 permitiu identificação de pontos a serem explorados para futuros trabalhos, tais como:

- Estudo da influência da síntese *de novo* dos ácidos graxos na biossíntese dos ramnolipídeos;
- Estudo da influência de diferentes processos celulares básicos (biossíntese de aminoácidos, metabolismo energético, mecanismos de transporte, entre outros) na biossíntese dos ramnolipídeos.

7.3. CORRELACIONADAS COM A INTERAÇÃO DOS ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FES E COM O TRANSCRIPTOMA DE *P. aeruginosa* PAO1

- Estudos de microscopia eletrônica de varredura dos cultivos sólidos, para se verificar se o crescimento da bactéria neste sistema ocorre na forma de biofilme. Crescendo na forma de biofilme *P. aeruginosa* apresenta uma intensa super-expressão do sistema QS e esta pode ser umas das explicações dos altos níveis de ramnolipídeos que foram obtidos com este trabalho;
- Estudos transcricionais (microarranjos e PCR quantitativo) dos cultivos sólidos (biofilme). Através destes estudos poder-se-á se dimensionar qual é a influência do sistema QS na produção de ramnolipídeos por FES;
- Estudos transcricionais comparativos entre cultivos de FES e de fermentação submersa. Através desta comparação melhor se entenderá as diferenças entre os dois processos a nível fisiológico- molecular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVAREZ-ORTEGA, C.; HARWOOD, C.S. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration **Molecular Microbiology**, v. 65, p. 153-165, 2007.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

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

BENINCASA, M; ACCORSINI, F.R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3843-3849, 2008.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.

BORDAS, F.; LAFRANCE, P.; VILLEMUR, R. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids **Environmental Pollution**, v. 138, p. 69-76, 2005.

BORDOLOI, N.K.; KONWAR, B.K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 495-505, 2009.

BUGAY, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de Produção e Caracterização. 82f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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

CAIAZZA, N.C.; SHANKS, R.M.; O'TOOLE, G.A. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *pseudomonas aeruginosa* **Journal Bacteriology**, v.187, p.7351-7361, 2005.

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

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

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

CHEN, C.C.; RIADI, L.; SUH, S.J.; OHMAN, D.E.; JU, L.K. Degradation and synthesis kinetics of quorum-sensing autoinducer in *Pseudomonas aeruginosa* cultivation **Journal of Biotechnology**, v.117, p. 1-10, 2005.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

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

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

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

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1191-1199, 2007.

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

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *P. aeruginosa* strain 57RP **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1485, p. 145-152, 2000.

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

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

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.113-125, 2003.

FORSYTHE, R.G.; KARP, P.D.; MAVROVOUNIOTIS, M.L. Estimation of equilibrium constants using automated group contribution methods **CABIOS**, v.13, p. 537-543, 1997.

GEORGE, S., JAYACHANDRAN, K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange *Pseudomonas aeruginosa* fruit peeling as sole carbon source **Applied Biochemistry Biotechnology**, in press, 2009.

GILBERT, K.B.; KIM, T.H.; GUPTA, R.; GREENBERG, E.P.; SCHUSTER, M. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR **Molecular Microbiology**, v. 73, p. 1072-1085, 2009.

HE, B.; SMITH J.M.; ZALKIN, H. Escherichia coli purB gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation by purR **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 130-6, 1992.

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

HERVÁS, A.B.; CANOSA, I.; SANTERO, E. Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 416-420, 2008.

HEURLIER, K.; WILLIAMS, F.; HEEB, S.; DORMOND, C.; PESSI, G.; SINGER, D.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P.; HAAS, D. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in

Pseudomonas aeruginosa PAO1 **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 2936-2945, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

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

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

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMOTA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin **Journal of Antibiotics**, v. 24, p. 855-859, 1971.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of American Chemistry Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance **Current Science**, v. 77, p. 116-126, 1999.

KRIEGER, N; CAMILIOS NETO, D; MITCHELL DA. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: **Biosurfactants**, 1. ed. Sen, R. (Org), Landes Bioscience, 2010.

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

LANG, S.; WAGNER, F. *in*: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (eds.) **Biosurfactants and Biotechnology**, New York: M. Dekker Inc., 1987, p. 2145.

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

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

LEWENZA, S.; GARDY, J.L.; BRINKMAN, F.S.; HANCOCK, R.E. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* exported proteins using a consensus computational strategy combined with a laboratory-based PhoA fusion screen **Genome Research**, v.15, p. 321-329, 2005.

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

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

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

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

MATSUFUJI, M.; NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 1213-1215, 1997.

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

MEIRA, J.A. Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos. 94f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MILLER, D.J.; ZHANG, Y.; ROCK, C.O.; WHITE, S.W. Structure of RhIG, an essential β -ketoacyl reductase in the rhamnolipid biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 18025-18032, 2006.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K.; DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DESGRANGES, C.; CROOKE, P.S.; HONG, K.; MALANEY, G.W.; TANNER, R.D. Reactor design. In: **Solid Substrate Cultivation**. Doelle, H.W.; Mitchell, D.A.; Rolz, C.E. (eds.) Elsevier Applied Science. London. pp. 115-139. 1992.

MITCHELL, D. A. (Org.); KRIEGER, Nadia (Org.); BEROVIC, Marin (Org.). **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2006. v. 1. 450 p.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the Zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 127-135, 1999

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 137-147, 2003.

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

MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; DE SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and Structural Characterization of the Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614 **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENGGERDY, R.P. Principles of the Solid Substrate Fermentation . In: **Filamentous Fungi**. 4. Ed. JE Smith, DR Berry and B Kristianse, E Arnold. (eds.). p. 117-144, 1983.

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 372-378, 2009.

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

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: Na update on the general aspects of these remarkable biomolecules **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇAVES, L.A.G.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NOORDMAN, W.H.; JANSSEN, D.B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa* **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4502-4508, 2002.

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

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

OHNO, A; ANO, T.; SHODA, M. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 817-822, 1992.

OHNO, A; ANO, T.; SHODA, M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 23-27, 1993.

OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin a and surfactin by a dual producer, *Bacillus* RB14, in solid-state fermentation **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 517-519, 1995a.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p, 209-214, 1995b.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22 **Process Biochemistry**, p. 31, p. 801-806, 1996.

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

PANDEY, A. Solid-state fermentation **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.81-84, 2003.

PARRA, J.L.; GUINEA, J.; MANRESA, A.; ROBERT, M.; MERCADE, M.E. COMELLES, F.; BOSCH, M.P. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 66, p. 141-145, 1989.

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

PRIETO, L.M.; MICHELON, M.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. The production of rhamnolipid by strain isolated from a southern coastal zone in Brazil **Chemosphere**, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

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

RAMILO, C.A.; EVANS, J.N.S. Overexpression, Purification, and characterization of tyrosine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase from *Escherichia coli* **Protein Expression and Purification**, v. 9, p. 253-261, 1997.

RHAMAN, K.S.M.; RHAMAN, T.J.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials **Biotechnology Progress**, v. 18, . 1277-1281, 2002.

REILING, H.E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L.H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 985-989, 1986.

REHM, B.; MITSKY, T.A.; STEINBÜCHEL, A. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *Pseudomonads*: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *escherichia coli* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3102-3109, 2001.

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

SALUM, T.F.C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C.I.; CÔCCO, L.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11 **Process Biochemistry**, submetido Novembro, 2009.

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

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

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* pa1 isolated in oil environments **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 159-166, 2002.

SCHUSTER, M.; GREENBERG, E.P. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa* **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 73-81, 2006.

SCHUSTER, M.; GREENBERG, E.P. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon **BMC Genomics**, v. 8, p. 287-296, 2007.

SCHUSTER, M.; HAWKINS, A.C.; HARWOOD, C.S.; GREENBERG, E.P. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 973-985, 2004.

SCHUSTER, M.; LOSTROH, C.P; OGI, T.; GREENBERG, E.P. Identification, timing, and tignal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a Transcriptome Analysis **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2066-2079, 2003.

SCHLICTMAN, D.; KUBO, M.; SHANKAR, S.; CHAKRABARTY, A.M. Regulation of Nucleoside Diphosphate Kinase and Secretable Virulence Factors in *Pseudomonas*

aeruginosa: Roles of *algR2* and *algH* **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 2469-2474, 1995.

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

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

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

SKIPSKI, V.P. Thin-layer chromatography of neutral glycolipids **Methods in Enzymology**, v. 35, p. 396-425, 1975.

SMITH, R.S.; IGLEWSKI, B. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 56-60, 2003.

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

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

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874 **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 40, p. 61-67, 1985.

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

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

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

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

WU, J.Y.; YEH, K.L.; LU, W.B.; LIN, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1157-1164, 2008.

VALLEA, F.; BECERRILA, B.; CHEN, E.; SEEBURG, P.; HEYNEKER, H.; BOLIVAR, F. Complete nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene from *Escherichia coli* K-12 **Gene**, v. 27, p. 193-199, 1984.

VAN DELDEN, C.; COMTE, R.; BALLY, M. Stringent Response Activates Quorum Sensing and Modulates Cell Density-Dependent Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5376-5384, 2001.

VANDENBERGHE, L.P.S, SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger* **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.

VEENANADIG, N.K.; GOWTHAMAN, M.K.; KARANTH, N.G.K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000.

VENTURI, V.; OTTEVANGER, C.; LEONG, J.; WEISBEEK, P.J. Identification and characterization of a siderophore regulatory gene (*pfrA*) of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to the alginate regulatory gene *algQ* of *Pseudomonas aeruginosa* **Molecular Microbiology**, v. 10, p. 63-7, 1993.

VOYTAS, D. Preparation and analysis of DNA. *In*: AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.). **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 2-16.

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

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

Pseudomonas Genome Database - www.pseudomonas.com

ANEXOS

ANEXO 1- ARTIGO PUBLICADO

Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture - Applied Microbiology and Biotechnology, 2008

ANEXO 2- ARTIGO PUBLICADO

Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning soils - Biotechnology Journal, 2009

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)