KAREN LOPES ALMEIDA

Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolípidio.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

KAREN LOPES ALMEIDA

Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolípidio.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão corrigida. Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Almeida, Karen Lopes.
Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolipídio / Karen Lopes Almeida. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Gregório Cabrera Gomez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Produtos bacterianos de interesse biotecnológico: Biossurfactantes e Polihidroxialcanoatos.

Versão do título para o inglês: Production of rhamnolipids by *Pseudomonas* isolates: assessment of the effect of carbon and nitrogen sources in the composition of rhamnolipids

Descritores: 1. Ramnolipídios 2. *Pseudomonas* 3. Biossurfactantes I. Gomez, José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0187/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karen Lopes Almeida.

Título da Dissertação: Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolipídio.

Orientador(a): José Gregório Cabrera Gomez.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **340/09** referente ao projeto intitulado: "***Produção de ramnolipídios por isolados de Pseudômonas: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolípidio***" sob a responsabilidade de **Karen Lopes Almeida,** foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 22 de setembro de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

À minha mãe, Marisa Lopes Pinheiro,
por toda a dedicação, amor e incentivo.
Você é meu maior orgulho!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por sempre iluminar meu caminho, abençoar meus passos, me dar força e coragem para correr atrás dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelos ensinamentos de suma importância, pela paciência e incentivo.

À Profª Luiziana Ferreira da Silva pela colaboração e sugestões.

Aos amigos do laboratório pelo carinho com o qual me receberam, pelo apoio, compreensão e ajuda nos momentos de dúvida. Em especial, às minhas amigas Rominne e Karinna, por toda a amizade, auxílio e incentivo.

Às minhas amigas Thaís, Marcela, Claudia, Carolina, Juliana e Natália, pela amizade, pelos momentos de alegria, descontração e por estarem presentes nas horas difíceis. Conhecer vocês foi um presente de Deus!

À minha família, especialmente à minha mãe, que sempre me apoiou e lutou comigo por esta conquista. Vocês são minha fortaleza, meu orgulho, meus exemplos de vida!

Ao meu namorado, Wellington Moreira de França, pelo carinho, apoio, compreensão, amizade, cumplicidade e acima de tudo, pelo nosso amor que me incentiva, me fortalece e me faz muito feliz.

Finalmente, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro para execução desse trabalho.

RESUMO

ALMEIDA, K. L. **Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolípidio.** 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2011.

Ramnolipídios (RHLs) são biossurfactantes, formados por carboidratos combinados a ácidos hidroxialifáticos, produzidos por *Pseudomonas*. Este trabalho avaliou o potencial de produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*, considerando os efeitos das fontes de carbono e nitrogênio sobre a concentração e composição do produto-alvo. 47 isolados bacterianos foram avaliados de forma qualitativa quanto à capacidade de produzir ramnolipídios. Foram selecionados cinco isolados para avaliação em experimentos quantitativos de produção de ramnolipídios. Os cultivos foram realizados em 48 combinações diferentes de meio mineral (16 fontes de carbono e 3 fontes de nitrogênio). A produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) também foi avaliada, de forma a verificar se a produção destes poliésteres de alguma forma afeta a produção de ramnolipídios. Óleos de linhaça, canola e glicose foram as fontes de carbono que promoveram a formação de maiores quantidades de ramnolipídios. A partir de óleos vegetais, nitrato de sódio se mostrou a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios. Algumas variações nas concentrações dos monômeros de 3-hidroxiácidos (3HAs) foram observadas, porém o 3-hidroxidecanoato foi o principal constituinte em RHLs. Considerando os isolados avaliados nesse estudo, tanto fontes de carbono hidrofílicas quanto hidrofóbicas parecem favorecer a formação de RHLs, ao invés de PHAs. Nitrato de sódio e ureia também favoreceram uma maior produção de RHLs quando comparados com a produção de PHAs. A análise de PHAs e de RHLs purificados revelou a presença de 3-hidroxi-6-dodecenoato ($3HDd\Delta_6$), um composto proveniente exclusivamente da β-oxidação do ácido linoleico. Na biossíntese de PHAs a partir de óleo de linhaça, a β-oxidação de ácidos graxos parece contribuir cerca de 3 vezes mais com monômeros quando comparada à biossíntese de ácidos graxos. Por outro lado, β-oxidação e biossíntese de ácidos graxos contribuem igualmente na geração de 3HAs para biossíntese de RHLs. Esses resultados indicam que essas duas vias de metabolismo de ácidos graxos contribuem com intermediários metabólicos para a biossíntese de ramnolipídios, ao contrário ao reportado na literatura, demonstrando que é possível controlar a composição de 3-hidroxiácidos presentes nos RHLs pela oferta de óleos vegetais contendo diferentes ácidos graxos, como já havia sido reportado para PHAs.

Palavras-chave: Ramnolipídios. *Pseudomonas.* Biossurfactantes.

ABSTRACT

ALMEIDA, K. L. **Rhamnolipids production by *Pseudomonas* isolates: assessment of carbon and nitrogen sources effects on the rhamnolipids composition.** 2011. 102 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2011.

Ramnolipids (RHLs) are biosurfactants, composed of carbohydrates combined with hydroxyalyphatic acids, produced by *Pseudomonas*. This study evaluated the production of rhamnolipids by *Pseudomonas* isolates, considering the effects of carbon and nitrogen sources on the concentration and composition of the target-product. 47 bacterial isolates were qualitatively evaluated for their ability to produce rhamnolipids. Five isolates were selected for further quantitative evaluation. The cultures were performed in 48 different mineral medium compositions (combining 16 carbon sources and 3 nitrogen sources). The production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) was also evaluated to verify its influence on the production of rhamnolipids. Linseed oil, canola oil and glucose were the carbon sources that yielded the largest amounts of rhamnolipids. From plant oils, sodium nitrate proved to be the best nitrogen source for rhamnolipids production. Despite some variations in the molar fraction of 3-hydroxyacids (3HAs) were observed, 3-hydroxydecanoate was always the main constituent in RHLs. Considering the isolates in this study, both hydrophilic and hydrophobic carbon sources seem to favor the formation of RHLs instead of PHAs. Sodium nitrate and urea also favored a greater production of RHLs compared with the production of PHAs. The analysis of purified PHA and RHL revealed the presence of the 3-hydroxy-6-dodecenoate, a compound derived exclusively from β-oxidation of linoleic acid. In the biosynthesis of PHAs from linseed oil, the β-oxidation of fatty acids seems to contribute channeling about 3 times more monomers when compared with the contribution of the fatty acids biosynthesis. On the other hand, β-oxidation and biosynthesis of fatty acids equally contribute to the generation of 3HAs for RHLs biosynthesis. These results indicate that both fatty acids metabolic pathways contribute with intermediates for the biosynthesis of rhamnolipids, contrary to what is reported in the literature, demonstrating that it is possible to control the composition of 3-hydroxyacids present in RHLs by supplying plant oils containing different fatty acids, as had been reported for PHAs.

Key words: Rhamnolipids. *Pseudomonas.* Biosurfactants.

LISTA DE ILUSTAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos principais homólogos de ramnolipídio.....20

Figura 2 - Representação esquemática dos genes *las* e *rhl* envolvidos na síntese e regulação de ramnolipídios em *Pseudomonas aeruginosa*.....26

Figura 3 - Modelo metabólico para representar a biossíntese de ramnolipídios a partir de glicose.....27

Figura 4 - Representação geral dos PHAs.....28

Figura 5 - Síntese de PHAs de cadeia média.....29

Figura 6 - Modelo metabólico para representar a biossíntese de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos.....30

Figura 7 - Cultivo em meio mineral SW composto por nitrato de sódio e glicose, como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, evidenciando a produção de ramnolipídios pela formação de halos azuis escuros ao redor das colônias.....40

Figura 8 - Concentração de ramnose após diferentes tempos de hidrólise.....44

Figura 9 - Correlação entre as soluções-padrão que sofreram hidrólise e as soluções não submetidas a esse processo.....45

Figura 10 - Produção de ramnolipídios a partir de cultivos utilizando carboidratos ou glicerol.....46

Figura 11 - Produção de ramnolipídios a partir de cultivos utilizando ácido láurico e ácido octanoico.....47

Figura 12 - Produção de ramnolipídios a partir de cultivos utilizando óleos vegetais...48

Figura 13 - Análise por cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3HAs presentes em RHLs produzido pelo isolado LFM634 a partir de óleo de mamona.....52

Figura 14 - Espectros de massas de propil-ésteres de 3HAs do RHL purificado a partir do ensaio utilizando óleo de mamona.....52

Figura 15 - Correlação entre a concentração de ramnose e 3HAs presentes em RHLs a partir das diferentes fontes de nitrogênio fornecidas.....55

Figura 16 - Correlação entre a concentração de ramnose e 3HAs presentes em RHLs a partir das diferentes fontes de carbono fornecidas.....56

Figura 17 - Produção de polihidroxialcanoatos a partir de cultivos utilizando carboidratos ou glicerol.....57

Figura 18 - Produção de polihidroxialcanoatos a partir de cultivos utilizando ácidos láurico e octanoico.....58

Figura 19 - Produção de polihidroxialcanoatos a partir de cultivos utilizando óleos vegetais.....58

Figura 20 - Análise por cromatografia gasosa de células liofilizadas do isolado LFM634 cultivado com óleo de mamona.....61

Figura 21 - Análise por cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3HAs presentes em PHAs produzidos pelo isolado RMP1256.....62

Figura 22 - Correlação entre a concentração de RHLs e PHAs de acordo com as diferentes fontes de carbono.....63

Figura 23 - Correlação entre a concentração de RHLs e PHAs de acordo com as diferentes fontes de nitrogênio.....64

Figura 24 - A) Correlação entre a propriedade emulsificante e a concentração de ramnolipídios; B) Correlação entre a propriedade emulsificante e a relação 3HA/Ram.....66

Figura 25 - Cinética de crescimento e geração de produtos pelo isolado RMP1256 cultivado em óleo de linhaça como única fonte de carbono.....68

Figura 26 - Composição dos RHLs (A) ou PHAs (B) ao longo do cultivo em biorreator com o isolado RMP1256 utilizando óleo de linhaça.....70

Figura 27 - Análise por cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3HAs presentes em RHLs (A) ou PHAs (B) purificados, produzidos pelo isolado RMP1256 a partir do ensaio em biorreator com óleo de linhaça.....71

Figura 28 - Proposta do metabolismo de biossíntese de RHLs considerando a contribuição da β-oxidação de ácidos graxos.....72

Figura 29 - Correlação entre a concentração de ácido linoleico suprida e a fração molar do 3HDdΔ_6 detectado em (A) RHLs e (B) PHAs.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos diferentes congêneres e homólogos de ramnolipídios.....21

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos óleos vegetais obtida por análise de cromatografia gasosa.....33

Tabela 3 - Avaliação qualitativa da produção de ramnolipídios em meio de cultura SW.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3HA – 3-hidroxiácidos

3HHx – 3-hidroxihexanoato

3HO – 3-hidroxioctanoato

3HD – 3-hidroxidecanoato

3HDd – 3-hidroxidodecanoato

3HDdΔ_5 – 3-hidroxi-5-dodecenoato

3HDdΔ_6 – 3-hidroxi-6-dodecenoato

3HAA – ácido 3-(3-hidroxiacanoiloxi)-alcanoico

AN – Ágar Nutriente

CG – Cromatografia Gasosa

CN – Caldo nutriente

CTAB – Brometo de cetil trimetil amônio

CMC – concentração micelar crítica

E24 – Índice de emulsificação

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão

MM – meio mineral

MSC – massa seca celular

ORF – *open reading frame*

PHA – polihidroxialcanoatos

PHA_{MCL} – polihidroxialcanoatos de cadeia média

RT1 – ramnosiltransferase I

RT2 – ramnosiltransferase II

RHL – ramnolipídio

Rha - ramnose

rpm – revoluções por minuto

QS – *quorum-sensing*

SW – meio Siegmund –Wagner

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....16
2. OBJETIVO.....18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....19
3.1 *Pseudomonas*.....19
3.2 Ramnolipídios.....19
3.2.1 Estrutura dos RHLs.....19
3.2.2 Produção de RHLs.....22
3.2.3 Aplicações econômicas.....23
3.2.4 Biossíntese de ramnolipídios.....24
3.3 Polihidroxialcanoatos.....27
3.4 Inter-relações metabólicas da produção de RHLs e PHAs.....29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....31
4.1 Isolados bacterianos.....31
4.1.1 Preservação dos isolados bacterianos.....31
4.2 Meios de Cultura.....31
4.2.1 Ágar Nutriente e Caldo Nutriente.....31
4.2.2 Meio SW.....31
4.2.3 Meio Mineral.....32
4.2.3.1 Composição dos óleos vegetais.....33
4.3 Esterilização.....33
4.4 Seleção de melhores produtores de RHLs.....33
4.5 Cultivos de bactérias sob condições para produção de RHLs.....34
4.6 Cultivo em Biorreator.....34
4.7 Purificação de RHLs.....35
4.8 Extração de PHAs.....35
4.9 Metodologias analíticas.....35
4.9.1 Determinação do pH.....35
4.9.2 Concentração de Biomassa (Massa Seca Celular).....35
4.9.3 Determinação de PHAs.....35
4.9.4 Determinação de RHLs.....36
4.9.4.1 Presença de 3-hidroxiácidos.....36
4.9.4.2 Presença de ramnose.....36

4.10 Índice de Emulsificação (E_{24}) 37
4.11 Caracterização Molecular das Bactérias Selecionadas.....37
4.11.1 Extração de DNA genômico das bactérias selecionadas.....37
4.11.2 Amplificação da região 16S rDNA......37
4.11.3 Análise de DNA em gel de agarose......38
4.11.4 Purificação do DNA a partir do produto de PCR.....38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....39
5.1 Seleção de *Pseudomonas* para a produção de RHLs.....39
5.2 Cultivos para produção de RHLs.....42
5.2.1 Padronização da metodologia para análise de ramnose.....43
5.2.2 Avaliação da produção de RHLs.....45
5.2.3 Composição dos RHLs produzidos.....51
5.2.4 Avaliação da produção de PHAs.....56
5.2.5 Composição dos PHAs produzidos.....60
5.2.6 Correlação entre a produção de RHLs e PHAs.....62
5.2.7 Índice de emulsificação.....64
5.3 Ensaio em biorreator.....66
5.3.1 Crescimento celular e formação de PHAs e RHLs.....67
5.3.2 Produção simultânea de RHLs e PHAs.....68
5.3.3 Composição dos 3HAs presentes em RHLs e PHAs.....69
5.4 Correlação entre o 3HDdΔ_6 detectado em PHAs e RHLs e a concentração de ácido linoleico suprida.....72
6. CONCULSÕES.....74
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....75
REFERÊNCIAS.....76
ANEXOS.....86

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Biossurfactantes constituem um grupo diverso de moléculas com atividade tensoativa sintetizadas por micro-organismos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Até o presente, a maioria dos compostos usados no mercado é de origem química; entretanto, com a compatibilidade ambiental se tornando um fator cada vez mais importante na seleção de produtos químicos industriais, o interesse em surfactantes biológicos tem aumentado (DELEU e PAQUOT, 2004). Uma das mais importantes vantagens dos biossurfactantes quando comparados aos surfactantes químicos é sua aceitabilidade ecológica, devido à baixa toxicidade, natural biodegradabilidade e alta efetividade em extremas temperaturas, pH e salinidade (FIECHTER, 1992; ISHIGAMI, 1993; ROSENBERG, 1993).

Algumas aplicações ambientais têm sido atribuídas aos biossurfactantes, como biorremediação de hidrocarbonetos (BANAT, 1995; GEORGIOUS et al., 1992), poluentes orgânicos e solos contaminados com metais pesados, descontaminação de áreas impactadas com óleos e tratamento de derrames de petróleo (HESTER, 2001; O'CONNOR, 2002). Além do uso ambiental, estes compostos podem ser utilizados em uma ampla variedade de aplicações na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e química (BANAT et al., 2000; GEORGIOUS et al., 1992; ISHIGAMI, 1993).

Ramnolipídios são biossurfactantes produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005), os quais representam uma das mais importantes classes de surfactantes microbianos, demonstrando um alto rendimento de produção e consequentemente um ótimo potencial para exploração comercial (NITSCHKE et al., 2005a). Está entre os três biossurfactantes disponíveis comercialmente, junto com soforolipídios e surfactina, porém é o único aprovado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para aplicação em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Esses biossurfactantes são classificados como glicolipídios, pois são formados por carboidratos em combinação com ácidos hidroxialifáticos. As principais misturas encontradas são ramnosil-β-hidroxialcanoil-β-hidroxialcanoato (mono-ramnolipídio) e ramnosil-ramnosil-β-hidroxialcanoil- β-hidroxialcanoato (di-ramnolipídio) (DESAI e BANAT, 1997; SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005). As propriedades do ramnolipídio dependem da composição e distribuição dos homólogos, as quais variam de acordo com a linhagem bacteriana, condições de cultivo e composição do meio de cultura (GUERRA-SANTOS et al., 1984).

Atualmente, o fator econômico é o principal empecilho para o amplo uso de biossurfactantes (NITSCHKE e COSTA, 2010), o custo estimado de produção de RHLs é de 5 a 20 US$/kg, enquanto o custo de produção de surfactantes químicos, como o alquilpoliglicosídeo, está entre 1 e 3 US$/kg (REIS et al., 2011). Uma vantagem dos ramnolipídios é que eles podem ser produzidos a partir substratos hidrofílicos ou hidrofóbicos relativamente baratos, tais como carboidratos, óleos vegetais, ou ainda resíduos da indústria alimentícia (NITSCHKE et al., 2005a). O uso alternativo de substratos de baixo custo é uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento industrial para produção de biossurfactantes (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi explorar o potencial de produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas* obtidos em trabalhos anteriores. Os isolados foram selecionados tanto com relação à capacidade de produzir maiores quantidades de ramnolipídios como com relação à maior produtividade. Além disso, diferentes fontes de carbono (hidrofílicas e hidrofóbicas) e nitrogênio foram testadas com a finalidade de estabelecer condições para a produção de ramnolipídios de composições variáveis de forma controlada.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas* considerando os efeitos das fontes de carbono ou nitrogênio tanto na concentração de ramnolipídios produzida como na composição deste.

Os seguintes objetivos específicos foram definidos para atingir o objetivo geral acima:

- Selecionar as melhores bactérias produtoras de ramnolipídios;
- Caracterizar a produção de ramnolipídios avaliando 16 fontes de carbono e 3 fontes de nitrogênio;
- Avaliação dos efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolipídio produzido;
- Correlacionar à produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos;
- Avaliar a interferência da composição do ramnolipídio na propriedade emulsificante;
- Avaliar a contribuição de diferentes vias do metabolismo de ácidos graxos para biossíntese desses compostos (RHLs e PHAs).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Pseudomonas*

Pseudomonas são bactérias Gram-negativas, pertencem à classe γ-proteobacteria e podem ser isoladas de diferentes habitats (água, solo, plantas). Devido a sua ampla distribuição no ambiente e facilidade de cultivo, este gênero constitui-se em um dos grupos bacterianos melhor estudado (AAGOT et al., 2001) representando grande importância no processos industriais envolvendo biotransformações (WUBBOLTS e WITHOLT, 1998).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de usar diferentes substratos como glicerol, manitol, frutose, glicose, *n*-parafinas e óleos vegetais, para produzir ramnolipídios (DESAI e BANAT, 1997) e polihidroxialcanoatos (STEINBÜCHEL, 1991). Entretanto, também é conhecida por ser um patógeno humano oportunista que pode causar sérias infecções (PELCZAR et al., 1993), apresentando habilidade de desenvolvimento em quantidades mínimas de fontes de carbono, como resíduos de sabão e até anti-sépticos, como compostos quaternários de amônio (TORTORA et al., 2005).

3.2 Ramnolipídios

Os ramnolipídios (RHLs) são biossurfactantes glicolipídicos produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, e são os biotensoativos mais intensivamente estudados (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005). As funções fisiologias desses compostos ainda é especulativa e pouco conhecida. Acredita-se que os ramnolipídios são importantes na mobilidade celular, nas interações célula-célula, nos acessos aos substratos hidrofóbicos, nos fatores de virulência, expulsão de compostos tóxicos das células, formação de canais de água que são característicos em biofilmes (MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; NEALSON et al., 1970).

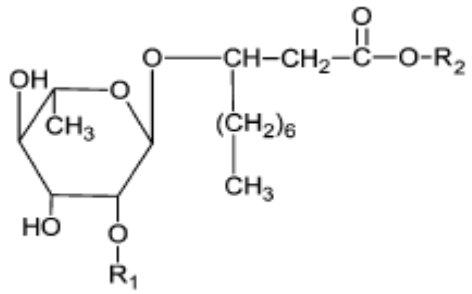
3.2.1 Estrutura dos RHLs

O ramnolipídio foi descrito primeiramente por BERGSTRÖM et al. (1946 a, b), neste período, eles reportaram o composto como um óleo glicolipídico produzido por *Pseudomonas pyocianea* (agora *P. aeruginosa*) crescida em glicose, que foi nomeado ácido piolípico. JARVIS e JOHNSON, em 1949, elucidaram a estrutura do ramnolipídio, demonstrando que este era constituído de duas moléculas de ácido β-hidroxidecanoico ligadas por ligações glicosídicas a duas moléculas de ramnose, ramnosil-ramnosil- β-hidroxidecanoil- β-

hidroxidecanoato, atualmente classificado como di-ramnolipídio (Figura 1).

ITOH e colaboradores (1971) isolaram e identificaram um novo RHL produzido por *P. aeruginosa* a partir de *n*-parafina, o mono-ramnolipídio (ramnosil- β-hidroxidecanoil- β-hidroxidecanoato), além disso, eles reportaram que este mono-RHL era o precursor para o di-RHL. Poucos anos depois, outros dois ramnolipídios mais hidrofílicos foram identificados em culturas de *Pseudomonas* sp. DSM 2874 a partir de *n*-alcanos ou glicerol (SYDALTK et al., 1985), similares aos anteriores, porém contendo apenas uma molécula de ácido β-hidroxidecanoico, o di-ramno-mono-lipídio (ramnosil-ramnosil- β-hidroxidecanoato) e o mono-ramno-mono-lipídio (ramnosil- β- hidroxidecanoato) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química dos principais homólogos de ramnolipídio.



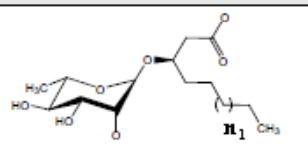
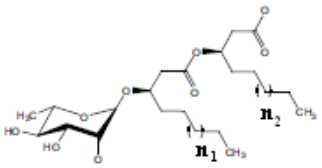
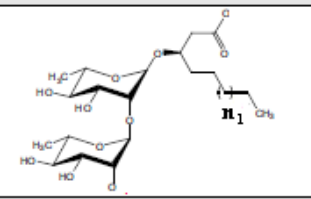
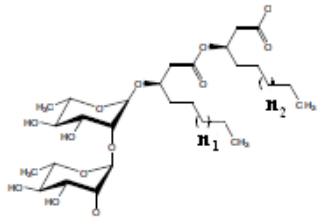
Tipo de ramnolipídio	R_1	R_2	Abreviação
$Rha_2C_{10}C_{10}$	L-α-ramnosil	ácido β-hidroxidecanoico	RL1
$RhaC_{10}C_{10}$	H	ácido β-hidroxidecanoico	RL2
Rha_2C_{10}	L- α -ramnosil	H	RL3
$RhaC_{10}$	H	H	RL4

Fonte: NITSCHKE et al., 2005a

Rha, ramnose; C10, ácido β-hidroxidecanoico.

Além destes, uma ampla variedade de diferentes homólogos tem sido descrita (Tabela 1), apresentando variações na composição da cadeia de ácidos graxos (C_8, C_{12}, $C_{14,}$ etc.) e demonstrando ainda formas insaturadas ($C_{12:1}$) (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). Entretanto, essas variantes foram sempre encontradas em menores quantidades na mistura de ramnolipídio (NITSCHKE et al., 2005a).

Tabela 1. Estrutura química dos diferentes congêneres e homólogos de ramnolipídios.

No.	Símbolo	Fórmula M.	P. M.	n_1	n_2	Estrutura
Mono-ramno-mono-lipídio						
1	Rha-$C_{8:2}$	$C_{14}H_{22}O_7$	302.32	1(−4H)	–	
2	Rha-C_8	$C_{14}H_{26}O_7$	306.35	1	–	
3	Rha-C_{10}	$C_{16}H_{30}O_7$	334.41	3	–	
4	Rha-$C_{12:2}$	$C_{18}H_{30}O_7$	358.43	5(−4H)	–	
5	Rha-C_{12}	$C_{18}H_{34}O_7$	362.46	5		
6	Rha-$C_{14:2}$	$C_{20}H_{34}O_7$	386.48	7(−4H)	–	
Mono-ramnolipídio						
7	Rha-C_8-C_8	$C_{22}H_{40}O_9$	448.55	1	1	
8	Rha-C_8-$C_{10:1}$	$C_{24}H_{42}O_9$	474.58	1	3(−2H)	
9	Rha-$C_{10:1}$-C_8	$C_{24}H_{42}O_9$	474.58	3(−2H)	1	
10	Rha-C_8-C_{10}	$C_{24}H_{44}O_9$	476.60	1	3	
11	Rha-C_{10}-C_8	$C_{24}H_{44}O_9$	476.60	3	1	
12	Rha-C_{10}-$C_{10:1}$	$C_{26}H_{46}O_9$	502.64	3	3(−2H)	
13	Rha-C_{10}-C_{10}	$C_{26}H_{48}O_9$	504.65	3	3	
14	Rha-C_8-C_{12}	$C_{26}H_{48}O_9$	504.65	1	5	
15	Rha-C_{12}-C_8	$C_{26}H_{48}O_9$	504.65	5	1	
16	Rha-C_{10}-$C_{12:1}$	$C_{28}H_{50}O_9$	530.69	3	5(−2H)	
17	Rha-$C_{12:1}$-C_{10}	$C_{28}H_{50}O_9$	530.69	5(−2H)	3	
18	Rha-C_{10}-C_{12}	$C_{28}H_{52}O_9$	532.71	3	5	
19	Rha-C_{12}-C_{10}	$C_{28}H_{52}O_9$	532.71	5	3	
20	Rha-C_{10}-$C_{14:1}$ [a]	$C_{30}H_{54}O_9$	558.74	3	7(−2H)	
21	Rha-C_{12}-$C_{12:1}$ [a]	$C_{30}H_{54}O_9$	558.74	5	5(−2H)	
22	Rha-C_{10}-C_{14} [a]	$C_{30}H_{56}O_9$	560.76	3	7	
23	Rha-C_{12}-C_{12}	$C_{30}H_{56}O_9$	560.76	5	5	
24	Rha-C_{12}-C_{14}	$C_{32}H_{60}O_9$	588.81	5	7	
25	Rha-C_{14}-C_{14}	$C_{34}H_{64}O_9$	616.87	7	7	
26	Rha-C_{14}-C_{16}	$C_{36}H_{68}O_9$	644.92	7	9	
27	Rha-C_{16}-C_{16}	$C_{38}H_{72}O_9$	672.97	9	9	
Di-ramno-mono-lipídio						
28	Rha-Rha-C_8	$C_{20}H_{36}O_{11}$	452.49	1	–	
29	Rha-Rha-C_{10}	$C_{22}H_{40}O_{11}$	480.55	3	–	
30	Rha-Rha-$C_{12:1}$	$C_{24}H_{42}O_{11}$	506.58	5(−2H)	–	
31	Rha-Rha-C_{12}	$C_{24}H_{44}O_{11}$	508.60	5	–	
32	Rha-Rha-C_{14}	$C_{26}H_{48}O_{11}$	536.65	7	–	
Di-ramnolipídio						
33	Rha-Rha-C_8-C_8	$C_{28}H_{50}O_{13}$	594.69	1	1	
34	Rha-Rha-C_8-C_{10}	$C_{30}H_{54}O_{13}$	622.74	1	3	
35	Rha-Rha-C_{10}-C_8	$C_{30}H_{54}O_{13}$	622.74	3	1	
36	Rha-Rha-C_{10}-$C_{10:1}$	$C_{32}H_{56}O_{13}$	648.78	3	3(−2H)	
37	Rha-Rha-C_{10}-C_{10}	$C_{32}H_{58}O_{13}$	650.79	3	3	
38	Rha-Rha-C_8-$C_{12:1}$	$C_{32}H_{56}O_{13}$	648.78	1	5(−2H)	
39	Rha-Rha-$C_{12:1}$-C_8	$C_{32}H_{56}O_{13}$	648.78	5(−2H)	1	
40	Rha-Rha-C_{10}-$C_{12:1}$	$C_{34}H_{60}O_{13}$	676.83	3	5(−2H)	
41	Rha-Rha-$C_{12:1}$-C_{10}	$C_{34}H_{60}O_{13}$	676.83	5(−2H)	3	
42	Rha-Rha-C_{10}-C_{12}	$C_{34}H_{62}O_{13}$	678.84	3	5	
43	Rha-Rha-C_{12}-C_{10}	$C_{34}H_{62}O_{13}$	678.84	5	3	
44	Rha-Rha-C_{10}-$C_{14:1}$	$C_{36}H_{64}O_{13}$	704.89	3	7(−2H)	
45	Rha-Rha-C_{12}-$C_{12:1}$	$C_{36}H_{64}O_{13}$	704.89	5	5(−2H)	
46	Rha-Rha-$C_{12:1}$-C_{12}	$C_{36}H_{64}O_{13}$	704.89	5(−2H)	5	
47	Rha-Rha-C_{12}-C_{12}	$C_{36}H_{66}O_{13}$	706.90	5	5	
48	Rha-Rha-C_{12}-C_{14}	$C_{38}H_{70}O_{13}$	734.95	5	7	
49	Rha-Rha-C_{14}-C_{12}	$C_{38}H_{70}O_{13}$	734.95	7	5	
50	Rha-Rha-C_{14}-C_{14}	$C_{40}H_{74}O_{13}$	763.00	7	7	
51	Rha-Rha-C_{14}-C_{16}	$C_{42}H_{78}O_{13}$	791.06	7	9	
52	Rha-Rha-C_{16}-C_{14}	$C_{42}H_{78}O_{13}$	791.06	9	7	
53	Rha-Rha-C_{16}-C_{16}	$C_{44}H_{82}O_{13}$	819.11	9	9	

Fonte: ABDEL-MAWAGOUD et al., 2010 (modificado).

Utilizando técnica de cromatografia líquida associada à espectrometria de massa, LÉPINE e colaboradores (2002) demonstraram que *P. aeruginosa* também é capaz de produzir ácido 3-(3-hidroxialcanoiloxi)-alcanoico (3HAA, isto é, dois 3-hidroxiácidos ligados e sem ramnose), juntamente com os outros compostos químicos detectados em ramnolipídios.

Assim, a literatura demonstra que bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir biotensoativos, que são constituídos por misturas de compostos químicos com estruturas diversas, entretanto, pouca informação ainda está disponível que permita a produção de ramnolipídios de composição variável de forma controlada.

A produção de ramnolipídios também tem sido relatada para outras espécies de *Pseudomonas* diferentes de *P. aeruginosa*: *P. alcaligenes* (OLIVEIRA et al., 2009), *P. cepacia, P. fluorescens, P. luteola, P. putida, P. stutzeri, P. teessidea* (OBASLI e ASLIM, 2009), *P. chlororaphis* (GUNTHER et al., 2005, 2006), *P. clemancea* e *P. collierea* (RAHMAN et al., 2009); e também para outros gêneros, como *Acinetobacter, Pantoea, Enterobacter* (ROONEY et al., 2009), *Pseudoxanthomonas* (NAYAK et al., 2009) e *Burkholderia* (ANDRÄ et al., 2006; DUBEAU et al., 2009; HÄUSSLER et al., 1998; PAJARRON et al., 1993).

3.2.2 Produção de RHLs

Fatores nutricionais e ambientais ao qual o micro-organismo é submetido podem afetar o rendimento ou até mesmo alterar a composição do produto desejado (SANTOS et al., 2002). Para a produção de altas quantidades de ramnolipídios dois fatores importantes devem ser considerados: o excesso de fonte de carbono e a limitação do crescimento, que é obtida através da restrição da concentração de nitrogênio e/ou íons multivalentes (LANG e WULLBRANDT, 1999).

Muitos autores reportaram que os nutrientes que compõem o meio de cultura afetam a produção de RHLs, principalmente a fonte de carbono (GUERRA-SANTOS et al., 1984), pois esta exerce uma influência importante tanto na cinética e conversão do produto desejado, como na proporção de ramnolipídios produzidos (mono ou di-ramnolipídio) (SANTOS et al., 2002). RHLs podem ser produzidos a partir de substratos hidrofílicos (tais como, carboidratos e glicerol) e hidrofóbicos (como por exemplo, óleos vegetais e alcanos) (DESAI e BANAT, 1997). MATA-SANDOVAL et al., (2001) trabalhando com uma linhagem de *P. aeruginosa* UG2 observaram que substratos hidrofóbicos promovem formação de maiores quantidades de RHLs quando comparados a substratos hidrofílicos. COSTA et al., (2009b) observaram que a produção de RHLs variava dependendo da fonte de carbono e da linhagem bacteriana avaliada.

A utilização de substratos alternativos (por exemplo, borra oleosa, óleos usados, glicerol, etc.) constitui uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento da produção industrial de biossurfactantes, bem como redução dos custos de produção (COSTA,

2010). Óleos vegetais e resíduos do refino destes estão entre os substratos alternativos mais utilizados na produção de RHLs (NITSCHKE et al., 2005a). COSTA e colaboradores (2006) utilizaram óleos nativos do Brasil (buriti, cupuaçu, maracujá, andiroba, castanha-do-pará e babaçu) como fontes de carbono para *P. aeruginosa* LBI e obtiveram produção de altas concentrações de RHLs com óleo de castanha-do-pará (9,9 g/L).

A fonte de nitrogênio também é um fator importante a ser considerado uma vez que a limitação deste componente promove a síntese de RHLs em *P. aeruginosa*. O nitrogênio pode ser um regulador na síntese de RHLs desempenhando um importante papel na produção de RHLs (DESAI e BANAT, 1997; GUERRA-SANTOS et al., 1984). Segundo alguns autores (KÖHLER et al., 2000; MULLIGAN e GIBBS, 1989; VAN ALST et al., 2007; VENKATA RAMANA e KARANTH, 1989) a produção de ramnolipídios é inibida na presença de amônia; glutamina, asparagina e arginina como fontes de nitrogênio e promovida na presença de nitrato, glutamato e aspartato.

Condições de crescimento e fatores ambientais, tais como pH, temperatura, agitação e oxigênio disponível podem afetar o crescimento celular, e consequentemente, a eficiência na produção de RHLs (KOSARIC et al., 1983; WEI et al., 2005). LEE et al. (2004) avaliaram o efeito de diferentes valores de pH (3-11) no crescimento celular e na produção de RHLs por *P. aeruginosa* BYK-2 KCTC18012P e observaram os melhores valores de crescimento e produção com pH 7,0. Além disso, observaram que em pH abaixo de 6 e acima de 8 a produção de RHLs e o crescimento celular diminuíam drasticamente.

Em geral, todos esses fatores (fontes de carbono, quantidade de íons e nitrogênio no meio, além das estratégias de cultivo) podem influenciar o tipo, a qualidade e a quantidade dos RHLs produzidos, e devem ser considerados no processo de produção, necessitando de maior integração entre diferentes disciplinas e tecnologias (DELEU e PAQUOT, 2004).

3.2.3 Aplicações econômicas

Com a preocupação ambiental, o interesse em biossurfactantes tem aumentado, pois esses compostos apresentam muitas vantagens quando comparados aos surfactantes químicos (DELEU e PAQUOT, 2004). Eles demonstram excelente aceitabilidade ecológica, devido à baixa toxicidade, natural biodegradabilidade e alta efetividade em extremas temperaturas, pH e salinidade (FIECHTER, 1992; ISHIGAMI, 1993; ROSENBERG, 1993). Entretanto, o custo de produção ainda é o maior empecilho para o amplo uso de biossurfactantes.

GIANE et al. (1997) alcançaram a melhor produção de RHLs já reportada, mais de 100 g/L. Nesta proporção, os biossurfactantes começam a competir com o custo dos

surfactantes sintéticos (LANG e WULLBRANDT, 1999).

Os ramnolipídios podem ser aplicados na descontaminação de áreas impactadas com óleo (BANAT, 1995), na remoção de metais tóxicos do solo, nos processos de biorremediação (MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000), na produção de cosméticos e na indústria farmacêutica (STANGHELINI e MILLER, 1997; LANG e WULLBRANDT, 1999), na proteção agrícola (DESAI e BANAT, 1997) e controle biológico de patógenos de plantas (STANGHELLINI e MILLER, 1997). Além disso, os RHLs são os únicos biossurfactantes aprovados pela Agência de Proteção ambiental dos Estados Unidos para aplicações em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (NITSCHKE e COSTA, 2007). Esses compostos são também fontes de L-ramnose e 3-hidroxiácidos e há um grande interesse nesse aspecto devido às aplicações industriais destes produtos (HAUTHAL, 1994; GIANE et al., 1997; LANG e WULLBRANDT, 1999).

Esses glicolipídios apresentam atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral (HAFERBURG et al., 1987; STANGHELLINI e MILLER, 1997; SYLDATK et al., 1985), podendo ser utilizado, por exemplo no controle de patógenos de plantas. RHLs aumentam a permeabilidade da membrana em células bacterianas ocasionando morte celular. O biossurfactante provavelmente forma agregados moleculares na superfície da membrana, levando a formação de poros transmembrânicos (KING et al., 1991). Essa atividade também auxilia o transporte de drogas ao sítio de ação. O RHL em combinação com o antibiótico azitromicina, facilitou a destruição de células bacterianas devido ao aumento da permeabilidade membranar (KOHLER et al., 2007). A atividade antifúngica foi observada contra *Aspergillus Níger, Aureobasidium pullulans, Chaetonium globosum e Penicillum crysogenum* (ABALOS et al., 2001). Desempenham atividade antiviral contra patógenos como o vírus do mosaico do tabaco, podendo ser utilizados como aditivos em vacinas.

3.2.4 Biossíntese de ramnolipídios

Burger et al. (1963) reportaram o mecanismo de formação de RHLs envolvendo três reações sequênciais. A primeira reação é a dimerização de duas cadeias de ácido β-hidroxidecanoico, formando o β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato. O dímero, então sofre duas reações sequenciais de ramnosilação catalisadas por duas diferentes ramnosiltransferase: ramnosiltransferase I (RT1) e ramnosiltransferase II (RT2).

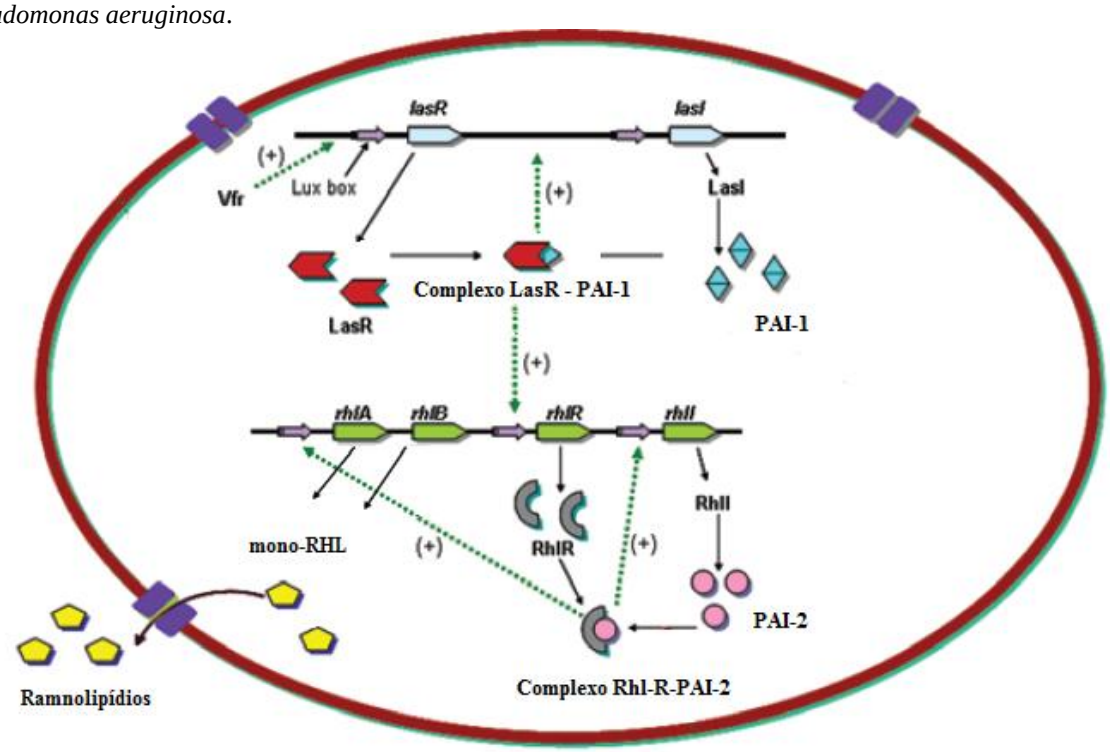
A síntese desses biossurfactantes é regulada por um complexo sistema de regulação gênica que também controla diferentes compostos associados a fatores de virulência, essa regulação a nível transcricional é chamada *quorum-sensing* (FUQUA e GREENBERG, 1998;

WINZER et al., 2000).

Quorum-sensing (QS) é um mecanismo pelo qual a bactéria realiza a comunicação célula-célula através de difusivas moléculas baseando-se na densidade celular crítica (WILLIAMS et al., 2007). Quando a densidade celular aumenta essas moléculas, denominadas autoindutores, são produzidas com a função de controlar diversos processos fisiológicos, como por exemplo, produção de exo-polissacarídios (DAVIES et al., 1998), resistência a antibióticos (BJARNSHOLT et al., 2005) e formação de biofilmes (DAVIES et al., 1998; HENTZER et al., 2001).

Para a produção de RHLs, *P. aeruginosa* processa dois inter-relacionados sistemas QS, nomeados *las* e *rhl* (GAMBELLO e IGLEWSKI, 1991; PASSADOR et al., 1993; TODER et al., 1991) O primeiro tem como regulador transcricional o LasR, que é ativado pelo autoindutor PAI-1 (*N*-(3-oxodecanoil))-homoserina lactona), cuja síntese é direcionada por LasI. O LasR e o PAI-1, formam o primeiro complexo envolvido na regulação da biossíntese de RHLs (Figura 2), ativando a transcrição dos genes *rhlR* e *rhlI.* A sintase RhlI, promove a síntese do autoindutor (PAI-2 - *N*-butanoil homoserina lactona), que forma um complexo com a proteína ativadora (RhlR) (OCHSNER et al.; 1994a; OCHSNER et al., 1995). Esse segundo complexo, é responsável pela ativação do operon *rhlAB*, cujos produtos são responsáveis pela síntese de mono-ramnolipídios (OCHSNER et al., 1995; DUSANE et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática dos genes *las* e *rhl* envolvidos na síntese e regulação de ramnolipídios em *Pseudomonas aeruginosa*.

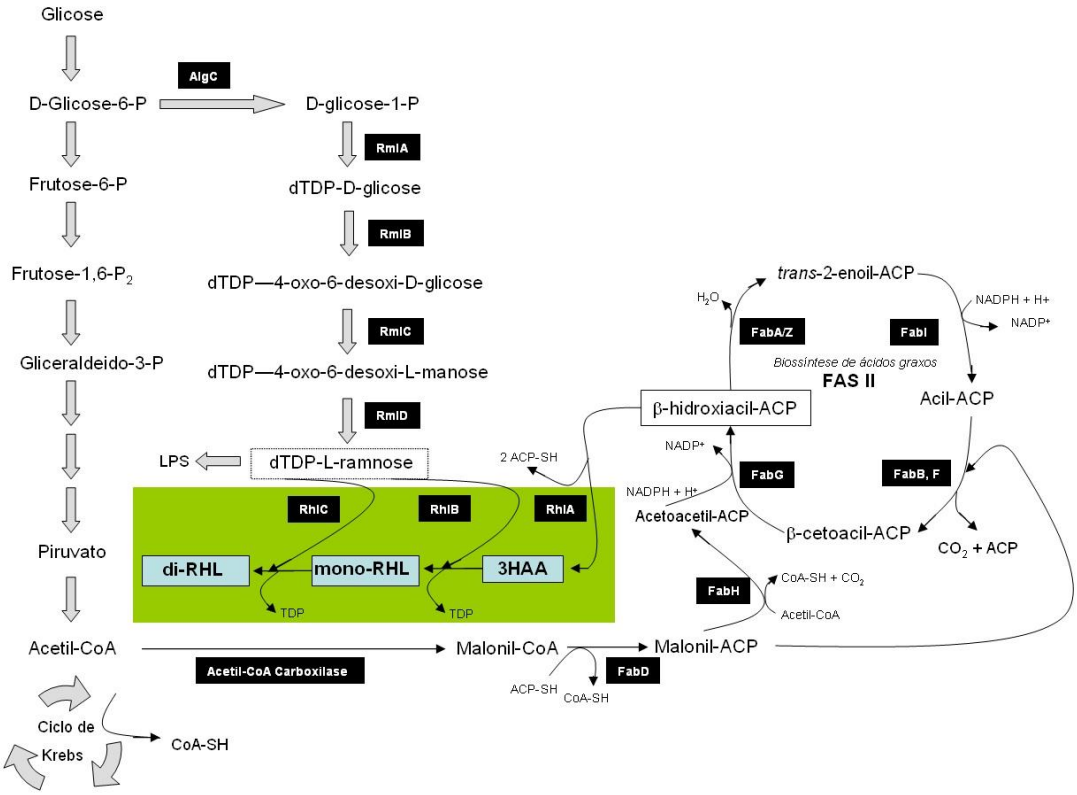


Fonte: DUSANE et al., 2010 (modificado).

O sistema *las* produz o ativador transcricional, LasR, que é ativado por PAI-1. Este complexo ativa a transcrição dos genes *rhlR* e *rhlI* que codificam a proteína reguladora e a sintase que promove a síntese do autoindutor, respectivamente. A proteína reguladora é ativada pela ligação do autoindutor originando um segundo complexo, o Rhl-R-PAI-2 que por sua vez ativa a transcrição do operon *rhlAB*.

Ochsner e colaboradores (1994b) demonstraram que o produto do gene *rhlB* corresponde a ramnosiltrasferase I (RT1). RAHIM e colaboradores (2001) identificaram o segundo gene que codifica para ramnosiltransferase II (RT2) em *P. aeruginosa,* o gene *rhlC* também regulado por QS, que utiliza o mono-ramnolipídio como precursor para a síntese do di-ramnolipídio. Em seguida, DÉZIEL e colaboradores (2003) reportaram que *rhlA* é requerido para a síntese de ácido 3-(3-hidroxialcanoloxi)-alcanoico (3HAA). ZHU e ROCK (2008) confirmaram que RhlA catalisa a condensação de duas moléculas de β-hidroxialcanoil-ACP, provenientes exclusivamente da biossíntese de ácidos graxos, para a formação do 3HAA, sendo este substrato para a RT1 (RhlB) formar o mono-ramnolipídio. A Figura 3 esquematiza as vias bioquímicas para a síntese de ramnolipídios.

Figura 3 - Modelo metabólico para representar a biossíntese de ramnolipídios a partir de glicose.



Trabalhos recentes (STRELEC, 2006; PEIXOTO, 2008), nos quais foi avaliada a produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas* a partir de glicose ou óleo de soja, demonstraram que a composição do ramnolipídio variava em função da fonte de carbono fornecida. Considerando, que os ácidos graxos presentes em óleo de soja são metabolizados pela β-oxidação, os resultados sugerem que essa via metabólica também pode contribuir com o fornecimento de 3-hidroxiácidos para biossíntese de ramnolipídios, ao contrário do que foi proposto por ZHU e ROCK (2008). A confirmação dessa hipótese é de grande relevância, pois permitiria modular a composição dos ramnolipídios produzidos em função das fontes de carbono ou misturas destas oferecidas à bactéria.

3.3 Polihidroxialcanoatos

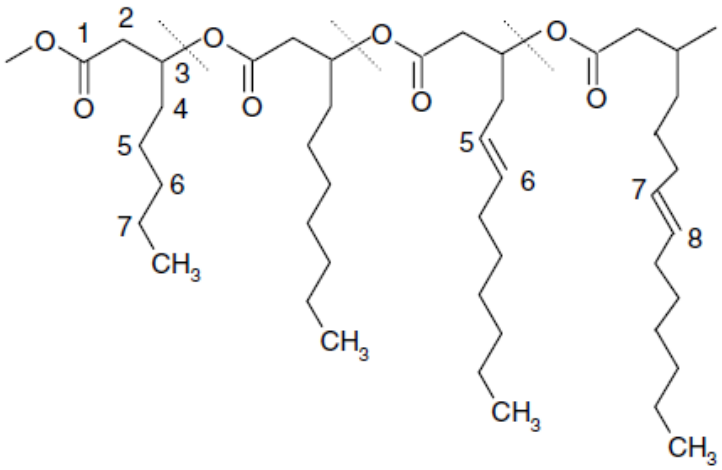
Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres que podem ser armazenados por diversas bactérias em grande quantidade na forma de grânulos intracelulares (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995). Esses grânulos intracelulares podem representar até cerca de 80% da massa seca celular (ANDERSON e DAWES, 1990), apresentando função de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. Para isso, a síntese de PHAs ocorre quando há

excesso de fonte de carbono disponível e limitação de no mínimo um nutriente essencial para o crescimento (BRANDL et al., 1990). Esses polímeros têm despertado o interesse científico e tecnológico devido a suas propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis (BAPTIST, 1962).

Bioplásticos bacterianos podem ser transformados em materiais que são adequados para substituir os materiais provenientes do petróleo em muitas aplicações, incluindo filmes de recobrimento para papel, papelão, etc (DE KONING et al., 1997), fontes de monômeros quirálicos para produtos farmacêuticos (WITHOLT e KESSLER, 1999), fibras e adesivos (CHEN, 2009). Os custos de produção desses bioprodutos são atualmente de 5-10 vezes maiores do que os custos para produção de plásticos petroquímicos, o que é um grande obstáculo para a comercialização bem sucedida de bioplásticos (REHM, 2010).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de sintetizar PHAs contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL} – do inglês "Polyhydroxyacids of Medium-Chain-Length"), compreendendo monômeros contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal (Figura 4) (STEINBÜCHEL, 1991).

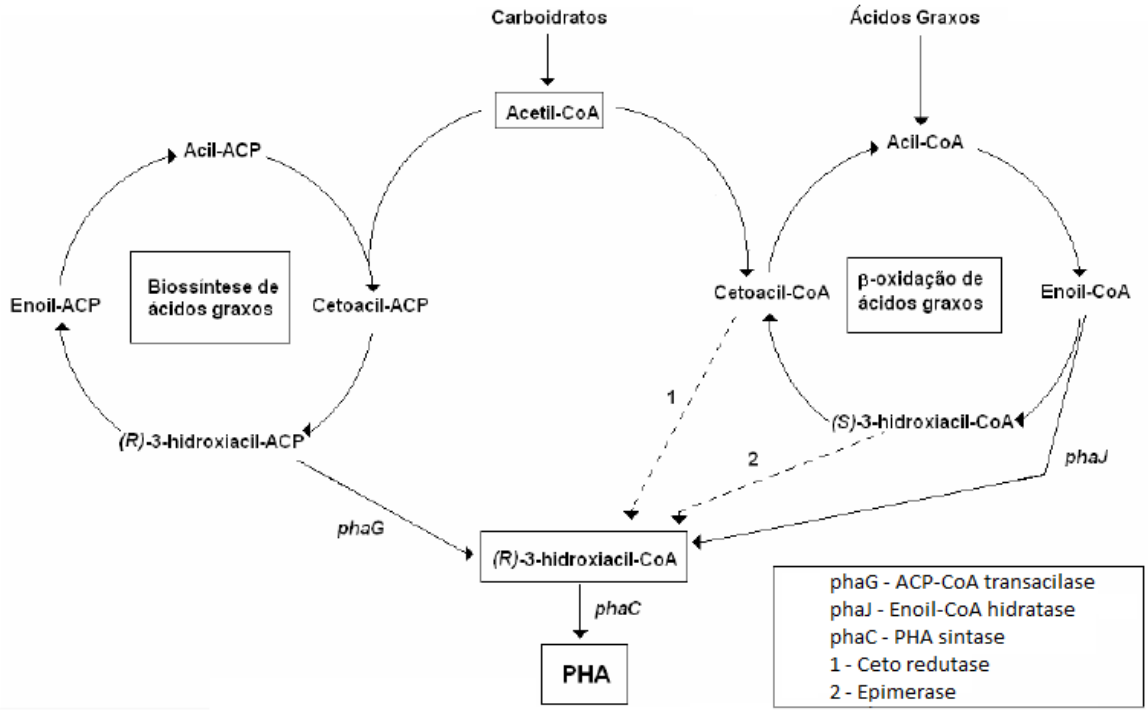
Figura 4 - Representação geral dos PHAs.



Fonte: SANCHEZ et al., 2003.

A síntese de PHA_{MCL} é dividida em dois grupos com base nos substratos fornecidos: a síntese a partir de substratos relacionados (hidrocarbonetos, alcoóis, ácidos carboxílicos), pois a composição do polímero produzido está estruturalmente relacionada ao substrato fornecido; e a síntese a partir de substratos não relacionados, aqueles que são metabolizados a acetil-CoA (glicose, frutose, acetato, glicerol), estes últimos produzem um polímero contendo 3-hidroxidecanoato (3HD) como principal constituinte (Figura 5).

Figura 5 - Síntese de PHAs de cadeia média.



Fonte: WITHOLT e KESSLER, 1999 (modificado).

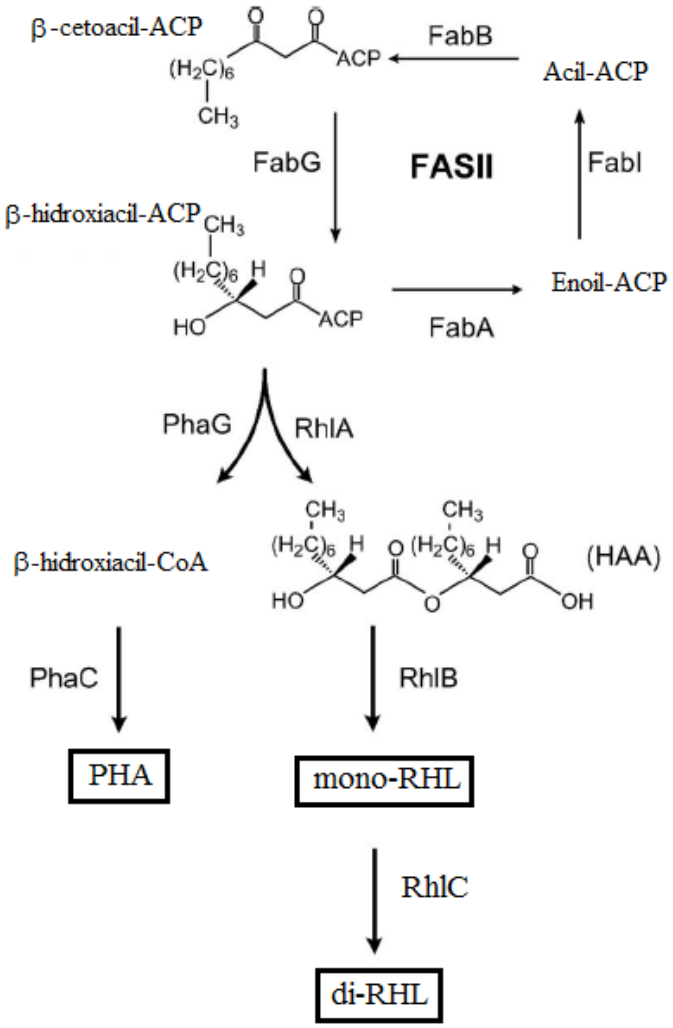
3.4 Inter-relações metabólicas da produção de RHLs e PHAs

Ramnolipídios e polihidroxialcanoatos podem ser produzidos simultaneamente (CHAYABUTRA et al., 2001; HORI e UNNO, 2002; STRELEC, 2006; MARSUDI et al., 2008). Segundo alguns autores, esse processo simultâneo possibilitaria a redução dos custos de produção de ambos os produtos. Os PHAs são encontrados no interior da célula bacteriana, portanto para a sua recuperação é necessário uma quebra da membrana e parede celular com consequente liberação do PHA, sendo que este processo é bastante representativo para o custo de produção. A produção de materiais secretados como os RHLs, em combinação com a produção de PHAs, representa um aumento na viabilidade dos processos de biocatálise, porque as células podem ser usadas para a produção de materiais secretados antes da recuperação final dos PHAs, e técnicas convencionais como a centrifugação podem ser usadas para a separação dos dois produtos (HORI et al., 2002; MARSUDI et al., 2008).

No entanto, esses compostos possuem precursores metabólicos comuns, os 3-hidroxiácidos, e as rotas de biossíntese de ambos podem competir por intermediários do metabolismo de ácidos graxos. De acordo com o que foi proposto por ZHU e ROCK (2008), RhlA e PhaG seriam responsáveis pela transferência de intermediários da biossíntese de ácidos graxos para a biossíntese de RHLs e PHAs, respectivamente (Figura 6). Desta forma,

uma melhor avaliação deve ser realizada a fim de verificar a viabilidade desses processos simultâneos.

Figura 6 - Modelo metabólico para representar a biossíntese de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos.



Fonte: ZHU e ROCK, 2008 (modificado).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos que foram utilizados neste estudo foram obtidos a partir de amostras de solo de canavial (GOMEZ, 2000), solo de Mata Atlântica (STRELEC, 2006) ou de lodo de esgoto (PEIXOTO, 2008) e foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. A linhagem *P. aeruginosa* ATCC 9027 (LFM719) foi utilizada como referência na produção de ramnolipídios nos experimentos de seleção de *Pseudomonas* para a produção de RHLs (item 5.1)

4.1.1 Preservação dos isolados bacterianos

Cada um dos isolados bacterianos foi cultivado em caldo nutriente por 24 horas e, em seguida, 5 mL de cada uma das culturas foram diluídos em 5 mL de uma solução aquosa de glicerol a 20%. A suspensão de células na solução de glicerol foi distribuída em tubos de microcentrífuga (1000 μL por tubo), que foram mantidos em congelador de refrigerador doméstico por 2 horas e finalmente congelados em freezer -80 ºC.

4.2 Meios de Cultura

Neste estudo, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Ágar Nutriente; Caldo Nutriente (Meio Complexo); SW (SIEGMUND e WAGNER, 1991); Meio Mineral (Meio sintético) (RAMSAY et al., 1990).

4.2.1 Ágar Nutriente e Caldo Nutriente

Os meios de cultura Ágar nutriente e Caldo Nutriente são designados de meios de cultura complexos e são adequados ao crescimento e manutenção de vários micro-organismos. A composição destes meios inclui 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona e 1 L de água destilada, somente para o Ágar Nutriente acrescenta-se 16 g de ágar-ágar que permite ao meio obter uma consistência sólida, de forma a proporcionar um suporte ao desenvolvimento das colônias de micro-organismos.

4.2.2 Meio SW

O meio de cultura SW (SIEGMUND e WAGNER, 1991) continha os seguintes compostos para cada litro de solução:

KCl 0,02M
Tris-HCl 0,12M
$MgSO_4$ 0,0016M
Azul de Metileno .....15 mg*
CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) .....200 mg
Ágar.....16 g
Fonte de carbono .....1 g
Fonte de nitrogênio 0,02M

O pH do meio de cultura foi ajustado para 7,2.

* a concentração de azul de metileno foi aumentada em seis vezes, em relação ao meio de cultura proposto por SIEGMUND e WAGNER (1991), seguindo uma adaptação proposta por PEIXOTO, 2008.

4.2.3 Meio Mineral

O meio de cultura mineral (RAMSAY et al., 1990) possuía os seguintes compostos para cada litro de solução:

Na_2HPO_4 .....3,5 g
KH_2PO_4 .....1,5 g
Citrato Férrico Amoniacal (sol. 6%).....1 mL
$MgSO_4.7\ H_2O$ (sol. 20%) .....1 mL
$CaCl_2 – 2H_2O$ (sol. 1%) .....1 mL
Solução de elementos traços .....1 mL

Composição da solução de elementos traços para 1 L:

H_3BO_3.....0,30 g
$CoCl_2 – 6H_2O$ .....0,20 g
$ZnSO_4 - 7H_2O$ ..... 0,10 g
$MnCl_2 – 4H_2O$ ..... 0,03 g
$NaMoO_4 – 2H_2O$ .....0,03 g
$NiCl_2 - 6H_2O$ .....0,02 g
$CuSO_4 - 5H_2O$ .....0,01 g

Neste meio, três fontes de nitrogênio foram adicionadas e testadas quanto à produção de biossurfactante, em diferentes cultivos: sulfato de amônio [$(NH_4)_2SO_4$], nitrato de sódio ($NaNO_3^-$) e ureia [$CO(NH_2)_2$], todas na concentração de 1 g/L.

Além das fontes de nitrogênio, dezesseis fontes de carbono foram avaliadas: glicose, frutose, glicerol (20 g/L), ácido láurico, ácido octanoico (5 g/L) e óleos de algodão, arroz, canola, coco, girassol, linhaça, mamona, milho, soja, palma e tungue (1% v/v, correspondendo a cerca de 9 g/L).

4.2.3.1 Composição dos óleos vegetais

AVILA-LEÓN e colaboradores (2007) avaliaram as composições de ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados nesse estudo, que são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos de óleos vegetais obtida por análise de cromatografia gasosa.

Óleos	Composição de ácidos graxos (% m/m)										
Vegetais	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1*	C18:3*
Algodão				0,27	14,64	3,78	21,77	55,08	4,46		
Arroz					16,79	3,96	36,99	39,77	2,49		
Canola	0,22	0,26	4,05	1,55	11,60	3,97	20,65	51,32	6,38		
Coco	2,21	2,63	43,15	16,32	9,68	3,71	18,94	3,33	0,04		
Girassol				0,08	8,95	4,16	20,70	62,42	3,70		
Linhaça					11,29	3,26	21,29	57,30	6,86		
Mamona					10,66	6,55	27,74	?	5,35	49,71	
Milho	0,13	0,15	2,37	0,91	11,38	3,93	24,83	50,84	5,45		
Palma	0,02	0,02	0,25	0,82	41,42	4,99	42,35	9,89	0,24		
Soja					11,16	3,73	24,46	54,87	5,78		
Tungue					8,63	6,52	22,75	19,41	?		42,69

Fonte: AVILA-LEÓN et al., 2007.

C8 – ácido octanoico, C10 – ácido decanoico, C12 – ácido láurico, C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C18 – ácido esteárico, C18:1 – ácido oleico, C18:2 – ácido linoleico, C18:3 – ácido linolênico, C18:1* - ácido ricinoleico, C18:3* - ácido α-eleosteárico. ? – valores não determinados pois outros compostos apresentavam o mesmo tempo de retenção destes ácidos graxos.

4.3 Esterilização

As soluções e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121°C, exceto os óleos vegetais que foram esterilizados em forno a 180 °C por 2 horas e as soluções de ácido láurico e azul de metileno que foram filtradas através de membrana de poro 0,22 μm (Millipore).

4.4 Seleção de melhores produtores de RHLs

Cada um dos isolados foi estriado em meio SW (SIEGMUND e WAGNER, 1991) e

incubado a 30 °C por até 7 dias. Nos meios de cultura SW, diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, glicerol e ácidos láurico e octanoico) e nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia) foram avaliadas. A formação de um halo de precipitado azul escuro ao redor da colônia indicava a produção de biossurfactante pelo micro-organismo.

Foram selecionados os isolados produtores de tensoativos que apresentaram formação de halos maiores ou em menor tempo de cultivo como melhores produtores de ramnolipídios para os estudos posteriores.

4.5 Cultivos de bactérias sob condições para produção de RHLs

Cada um dos isolados bacterianos selecionados para os ensaios em meio líquido foi estriado em ágar nutriente e cultivado por 24 horas. Colônias isoladas foram utilizadas para inocular 25 mL de caldo nutriente e incubadas por 24 horas em agitador rotativo (150 rpm, 30 ºC). Um volume de 1,5 mL da cultura em caldo nutriente foi utilizado para inocular 25 mL de meio mineral (meio de cultura sintético) contendo excesso de fonte de carbono (20 g/L de glicose, frutose, glicerol, 5 g/L de ácido láurico, ácido octanoico, ou 9 g/L de óleo vegetal) e quantidade limitada da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio ou ureia, todos na concentração de 1 g/L). As células foram cultivadas por 72 horas e a cultura foi analisada quanto a: pH, massa seca celular, quantidade e composição de PHAs. A produção de ramnolipídios foi caracterizada pelas seguintes metodologias: índice de emulsificação, composição de 3-hidroxiácidos (CG) e quantidade de ramnose (HPLC). Todas as análises foram realizadas em duplicata, nas quais a média e o desvio-padrão foram considerados.

4.6 Cultivo em Biorreator

Colônias isoladas em ágar nutriente (24 horas, 30 ^{o}C) foram inoculadas em caldo nutriente e incubadas em agitador rotativo (24 horas, 150 rpm, 30ºC). Esta cultura foi utilizada para inocular o meio mineral (RAMSAY et al., 1990) contendo óleo de linhaça (cerca de 9 g/L), como fonte de carbono, e, posteriormente, incubada (24 horas, 150 rpm, 30ºC). O cultivo em meio mineral foi inoculado em biorreator BBraum Biostat B (volume útil 2,5 litros) contendo meio mineral (Composição do meio para 1 L: 4,6 g de $NaNO_3^-$; 0,6 g de KH_2PO_4; 0,3 g de $MgSO_4.7\ H_2O$; 1 g de NaCl; 1 mL das soluções de $CaCl_2.2\ H_2O$ (1%), Citrato Férrico Amoniacal (6%) e 2 mL da solução de elementos traços). A temperatura foi controlada em 30^{o}C e o pH em 7,0 (com soluções de 0,5 N de NaOH e H_2SO_4). Ao longo do cultivo foram realizadas alimentações da fonte de carbono e retiradas amostras para analisar: massa seca celular, PHAs e RHLs.

4.7 Purificação de RHLs

Para purificação dos ramnolipídios, o sobrenadante da cultura foi acidificado com H_2SO_4 até pH 2,0 e mantido a 4 ºC por pelo menos 16 horas. Os ramnolipídios precipitados foram separados por centrifugação (8.000 rpm, 10 min., 4 ºC) (COSTA et al., 2009a). Com o objetivo de obter uma maior purificação, os ramnolipídios foram ressuspensos em solução de bicarbonato 50 mM (pH 7.0) e novamente precipitados seguindo o mesmo procedimento acima. Finalmente, o produto final obtido foi seco por liofilização.

4.8 Extração de PHAs

Cerca de 2 g de células foram transferidas para um tubo de vidro com tampa e adicionados 4 mL de clorofórmio. O tubo foi agitado por 24 horas para extração do polímero. Após filtração, para remoção de células, o clorofórmio foi evaporado, obtendo-se o PHA.

4.9 Metodologias analíticas

4.9.1 Determinação do pH

O sobrenadante resultante do cultivo de cada isolado foi separado das células por centrifugação e posteriormente determinado o pH em um potenciômetro (Tecnal – TEC-2), previamente calibrado utilizando soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.

4.9.2 Concentração de Biomassa (Massa Seca Celular)

Amostras das culturas (10 mL) foram centrifugadas (10000 rpm, 10 min., 4 ºC), lavadas duas vezes com uma solução de NaCl (0,85% m/v) e Tween 80® (0,1% v/v) e submetidas a liofilização. Após secagem a massa das amostras foi medida e a concentração da massa seca celular (g/L) foi determinada.

4.9.3 Determinação de PHAs

Cerca de 10 mg de células liofilizadas foram submetidas à propanólise em tubo ao qual foram adicionados: 2 mL de solução de HCl em propanol (1:4 v/v) e 2 mL de 1,2 dicloroetano. Uma solução de ácido benzoico (40g/L) em propanol foi utilizada como padrão interno (100 μL) (RIIS e MAI, 1988). Após vigorosa agitação, a mistura foi incubada em banho a 100 ^{o}C por 3 horas, agitando-se mais uma vez após os primeiros 30 minutos. Em seguida, resfriaram-se os tubos, adicionou-se água destilada (4 mL), agitou-se em agitador de tubos vórtex por 30 segundos e, após repouso, separou-se a fase orgânica inferior, contendo os

propil-ésteres. A concentração de propil-ésteres foi determinada por cromatografia gasosa. Cerca de 1 μL da fase orgânica foi analisada após a injeção fracionada (1:20) em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com uma coluna HP5, detectando-se os propil-ésteres por meio de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram 250 ^{o}C e 300 ^{o}C, respectivamente. Empregou-se um programa de temperatura da coluna para separar os propil-ésteres, que consistiu em 100 ^{o}C por 1 minuto, aumentando até 180^{o}C a uma razão de 8^{o}C/min e 180 ^{o}C por 15 minutos. O gás de arraste empregado foi hélio a uma vazão de 0,8 mL/min.

PHAs de composição conhecida, foram utilizados como padrão externo para identificação dos monômeros 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxioctanoato (3HO), 3-hidroxidecanoato (3HD), 3-hidroxidodecanoato (3HDd) e 3-hidroxi-5-dodecenoato (3HDdΔ_5). A identificação do monômero 3-hidroxi-6-dodecenoato (3HDdΔ_6) foi realizada seguindo o padrão de análise de SILVA-QUEIROZ et al. (2009).

4.9.4 Determinação de RHLs

Para determinação da quantidade e composição de ramnolipídios produzidos foram analisados os 3-hidroxiácidos e a ramnose presentes no sobrenadante.

4.9.4.1 Presença de 3-hidroxiácidos

A presença de 3-hidroxiácidos (3HAs) foi determinada colocando 5 mL do sobrenadante em tubos de ensaio com tampa e congelando-os inclinados para que se formassem uma rampa, aumentando, assim, a superfície de contato com o ar. Após o congelamento, esse sobrenadante foi liofilizado e, por fim, analisado seguindo a metodologia de propanólise e análise por cromatografia gasosa descrita no item 4.9.3.

4.9.4.2 Presença de ramnose

A ramnose presente no sobrenadante foi determinada por meio de uma hidrólise em que 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubos de ensaio com tampa, seguida da adição de 100 μL de uma solução H_2SO_4 a 10 M. A amostra foi aquecida a 98 °C por 5 horas e, ao final, foram acrescentados 100 μL de uma solução de NaOH a 10 M para neutralizar a reação. O sobrenadante, agora tratado, foi analisado em cromatógrafo líquido (HPLC) Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector por índice de refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H_2SO_4 5 mM com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 μL. Soluções de ramnose foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e

1,0 g/L e utilizadas como padrão para elaboração da curva de calibração.

4.10 Índice de Emulsificação (E_{24})

O índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado seguindo uma adaptação da metodologia de CHEN et al. (2007). Em tubo de vidro de 13 mm de diâmetro foi adicionado 2 mL de hexadecano e 2 mL de sobrenadante da cultura bacteriana. Os tubos foram agitados por 2 minutos e mantidos a temperatura ambiente por 24 horas. O índice de emulsificação corresponde à divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna, multiplicando o resultado por 100.

4.11 Caracterização Molecular das Bactérias Selecionadas

Os isolados selecionados foram caracterizados conforme descrito a seguir.

4.11.1 Extração de DNA genômico das bactérias selecionadas

Para extração de DNA genômico das bactérias selecionadas foi utilizado o kit de extração de DNA genômico DNeasy Blood e Tissue Kit (Qiagen) conforme as instruções do fabricante, após o cultivo das linhagens bacterianas por 12 horas em caldo nutriente.

4.11.2 Amplificação da região 16S rDNA.

O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores 27f e 1401r como indicado por HEUER e colaboradores (1997). A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) utilizando o kit GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Foram utilizados 2 µL de solução de DNA genômico contendo entre 30 e 150 ng/µl de DNA molde, 25 µL de GoTaq® Green Master Mix, 2 µL de iniciador 27f (10 µM) 5´AGA GTT TGA TCM TGGCTC AG, 2 µL iniciador 1410r (10 µM) 5´CCG ATS GCI CCS AGIGAG TG, completando com água livre de nuclease para um volume final de 50 µL. As condições de amplificação empregadas foram: uma desnaturação inicial por 2 min a 94 ºC, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94 ºC, 1 min a 56 ºC, 3 min a 72 ºC e uma extensão final 10 min a 72 ºC.

4.11.3 Análise de DNA em gel de agarose.

Para a visualização e análise de DNA foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em solução TAE (tris hidroximetil aminometano (Tris-Base) 242 g/L, ácido acético glacial 57,1 mL, 100 mL EDTA (etileno diamino tetracetato) 0,5M e 1000 mL H_2O), realizadas a 80 V, 110 mA, 90 W, por aproximadamente 1 hora. Os fragmentos de DNA foram corados em brometo de etídieo (0,1 mg/100 mL de TAE) por 20 minutos e visualizado sob luz UV (254 nm) em transiluminador (UVP Benchtop Transilluminator).

4.11.4 Purificação do DNA a partir do produto de PCR

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando o kit de purificação QIAquick PCR purification (QIAGEN),) conforme as instruções do fabricante, e encaminhado para sequenciamento. As reações foram executas no Centro de Estudos do Genoma Humano conforme o protocolo descrito no site da instituição (http://genoma.ib.usp.br). Os resultados dos sequenciamentos foram alinhados com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI (do inglês: *National Center for Biotechnology Information*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, 47 isolados bacterianos previamente identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e como capazes de produzir ramnolipídios foram avaliados quanto à capacidade de produzir esse biossurfactante. Os isolados foram estriados em 15 diferentes combinações de meio de cultura SW (5 fontes de carbono e 3 fontes de nitrogênio diferentes) apropriados para detecção da produção de tensoativos levemente aniônicos. A análise foi realizada de forma qualitativa, ou seja, foram identificados os melhores produtores de ramnolipídios com base no tamanho do halo formado, bem como se o halo era formado em um tempo menor de cultivo.

A partir dos resultados qualitativos, foram selecionados cinco isolados para avaliação em experimentos quantitativos de produção de ramnolipídios. Estes isolados foram avaliados com relação à produção de ramnolipídios em 48 combinações de meio mineral diferentes (16 fontes de carbono e 3 fontes de nitrogênio). O objetivo destes experimentos foi avaliar os efeitos das fontes de carbono e/ou nitrogênio na quantidade e composição do ramnolipídio produzido. Além disso, a capacidade emulsificante dos diferentes ramnolipídios produzidos foi avaliada com o objetivo de identificar se existe uma correlação entre a composição do biossurfactante e essa propriedade tensoativa. Foram ainda analisadas a quantidade e composição de polihidroxialcanoatos produzidos, de forma a avaliar inter-relações metabólicas na síntese dos dois compostos (ramnolipídios e polihidroxialcanoatos). E finalmente, uma situação foi escolhida para avaliação em ensaio de biorreator.

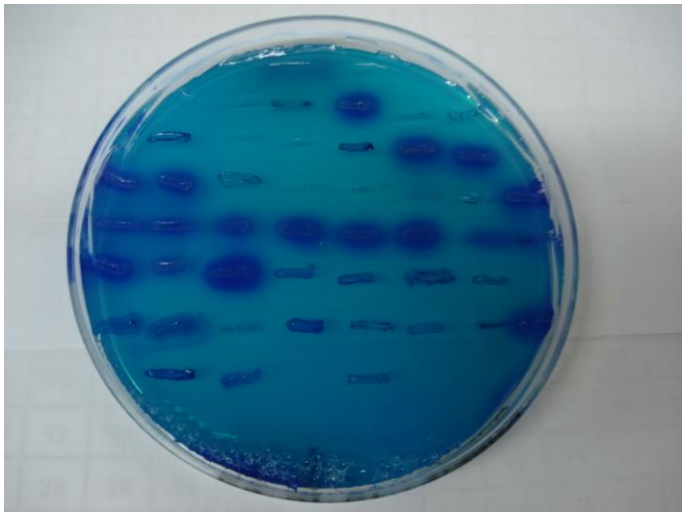
5.1 Seleção de *Pseudomonas* para a produção de RHLs

Os 47 isolados de *Pseudomonas* anteriormente detectados como produtores de ramnolipídios (GOMEZ, 2000; PEIXOTO, 2008; STRELEC, 2006) foram avaliados em meio mineral SW (SIEGMUND e WAGNER, 1991) contendo cinco fontes de carbono diferentes (glicose, frutose, glicerol, ácido octanoico e ácido láurico) e três fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia), todos realizados em duplicata. Este meio é composto por um surfactante catiônico (CTAB), o qual forma um complexo com moléculas aniônicas do ramnolipídio, podendo ser visualizado na presença do corante azul de metileno devido a formação de um precipitado azul escuro ao redor das colônias produtoras do tensoativo (SIEGMUND e WAGNER, 1991).

A Figura 7 representa um dos cultivos realizados em meio mineral SW no qual é possível visualizar a formação de halos azuis ao redor de alguns dos isolados bacterianos

estriados na placa, indicando a produção de RHLs.

Figura 7 - Cultivo em meio mineral SW composto por nitrato de sódio e glicose, como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, evidenciando a produção de ramnolipídios pela formação de halos azuis escuros ao redor das colônias.



Para 11 dos isolados (RMP1232, RMP1235, RMP1253, RMP1300, RMP1303, RMP1470, LFM642, LFM648, LFM705, LFM706 e LFM717) analisados não foi observada a formação de halos em qualquer dos meios de cultura testados (Tabela 3).

Para os meios de cultura que continham sulfato de amônio como fonte de nitrogênio não houve formação de halos ao redor das colônias por nenhum isolado testado, com exceção do cultivo utilizando ácido octanoico como fonte de carbono, no qual 27 isolados apresentaram formação do precipitado azul.

Nos meios de cultura contendo as outras fontes de nitrogênio (ureia e nitrato de sódio), foi observado um comportamento bastante variável dos diferentes isolados (Tabela 3). Oito isolados (RMP1256, RMP1315, RMP1316, RMP1321, RMP1322, RMP1484, RMP1485 e RMP1486) apresentaram a formação de halos intensos em todas as fontes de carbono avaliadas. Um isolado (RMP225) apresentou comportamento semelhante a esses isolados, porém nos meios de cultura contendo glicose como fonte de carbono foi observada a formação de halos pouco intensos. A linhagem de referência (*P. aeruginosa* ATCC9027 = LFM719) também apresentou halos intensos na maioria das fontes de carbono avaliadas, no entanto quando glicerol e ácido láurico foram supridos em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio, foram observados halos pouco intensos. Outro grupo de sete isolados (RMP1476, RMP1480, RMP1481, RMP1482, RMP1489, LFM171 e LFM634) também apresentou halos intensos nas diferentes fontes de carbono avaliadas, exceto quando

cultivados com ácido láurico. Para os demais isolados foram observados halos intensos ou pouco intensos em uma ou outra fonte de carbono ou nitrogênio.

Tabela 3 - Avaliação qualitativa da produção de ramnolipídios em meio de cultura SW.

Continua

	Sulfato de Amônio					Nitrato de Sódio					Ureia				
Isolado	G	F	GL	AL	AO	G	F	GL	AL	AO	G	F	GL	AL	AO
RMP 225	-	-	-	-	+	(+/-)	+	+	+	+	(+/-)	+	+	+	+
RMP 1201B	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	(+/-)	-	-
RMP 1232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RMP 1235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RMP 1253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RMP 1256	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1267	-	-	-	-	(+/-)	-	+	(+/-)	-	+	-	-	-	-	+
RMP 1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RMP 1303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RMP 1305	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-
RMP 1312	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	(+/-)	-	-	-	-
RMP 1313	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	+	-	-	-	-	-	-
RMP 1315	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1316	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1321	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1322	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1330	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	-	-
RMP 1336	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-
RMP 1340	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-
RMP 1349	-	-	-	-	+	(+/-)	(+/-)	+	-	+	(+/-)	+	(+/-)	-	+
RMP 1470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RMP 1476	-	-	-	-	+	+	+	+	(+/-)	+	+	+	+	-	+
RMP 1480	-	-	-	-	+	+	+	+	(+/-)	+	+	+	+	-	+
RMP 1481	-	-	-	-	+	+	+	+	(+/-)	+	+	+	+	-	+
RMP 1482	-	-	-	-	+	+	+	+	(+/-)	+	+	+	+	-	+
RMP 1484	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1485	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1486	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RMP 1487	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	(+/-)	-	+	-	+

Produção de ramnolipídios: +, formação de halo intenso em curto tempo de cultivo (inferior a 48h); -, não houve formação de halo; (+/-), formação de halo pouco intenso, ou ainda, formação de halo após longo tempo de cultivo (superior a 48h); Fontes de carbono avaliadas: G, glicose; F, frutose; GL, glicerol; AL, ácido láurico; AO, ácido octanoico.

Tabela 3 - Avaliação qualitativa da produção de ramnolipídios em meio de cultura SW.

Conclusão

	Sulfato de Amônio					Nitrato de Sódio					Ureia				
Linhagem	G	F	GL	AL	AO	G	F	GL	AL	AO	G	F	GL	AL	AO
RMP 1488	-	-	-	-	+	+	(+/-)	+	-	+	+	-	+	-	+
RMP 1489	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
LFM 171	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	(+/-)	+	+	-	+
LFM 634	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
LFM 635	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-
LFM 642	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFM 648	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFM 702	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	-	-
LFM 704	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	-	-
LFM 705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFM 706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFM 708	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-
LFM 709	-	-	-	-	+	(+/-)	+	-	-	+	+	(+/-)	(+/-)	-	+
LFM 710	-	-	-	-	+	-		-	-	+	+	-	(+/-)	-	+
LFM 715	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-
LFM 717	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFM 719	-	-	-	-	+	+	+	(+/-)	(+/-)	+	+	+	+	+	+
LFM 735	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	-	-
LFM 767	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	(+/-)	-	+	(+/-)	+

Produção de ramnolipídios: +, formação de halo intenso em curto tempo de cultivo (inferior a 48h); -, não houve formação de halo; (+/-), formação de halo pouco intenso, ou ainda, formação de halo após longo tempo de cultivo (superior a 48h); Fontes de carbono avaliadas: G, glicose; F, frutose; GL, glicerol; AL, ácido láurico; AO, ácido octanoico.

Foram selecionados como melhores produtores de biossurfactantes quatro isolados bacterianos que apresentaram formação de halos maiores ou em um tempo menor de cultivo: RMP1256, RMP1315, RMP1484 e RMP1486. O isolado LFM634 também foi selecionado uma vez que já existiam trabalhos que levaram a obtenção de mutantes dessa linhagem (STRELEC, 2006). Os isolados RMP1316, RMP1321, RMP1322 e RMP1485 também se mostraram bastante eficientes na produção de biossurfactante, entretanto, não foram selecionados devido a complexidade dos experimentos seguintes, que limitava o número máximo de isolados que poderiam ser avaliados.

5.2 Cultivos para produção de RHLs

Os cinco isolados bacterianos selecionados na etapa anterior foram avaliados em experimentos quantitativos. Os cultivos foram realizados em 48 combinações diferentes de meio mineral líquido (RAMSAY et al., 1990). Foram testadas as três fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia) e as cinco fontes de carbono (glicose, frutose,

glicerol, ácidos láurico e octanoico) utilizadas na etapa anterior. Além dessas fontes de carbono, onze óleos vegetais foram avaliados (algodão, arroz, canola, coco, girassol, linhaça, mamona, milho, palma, soja e tungue). Nesses cultivos, foram avaliadas tanto a produção de ramnolipídios como de polihidroxialcanoatos de forma a verificar se a produção destes poliésteres de alguma forma afeta a produção de ramnolipídios. Tabelas com os resultados completos destes experimentos são apresentadas no anexo A.

Os RHLs são compostos por moléculas de ácidos graxos e ramnose, desta forma, para avaliação da produção total de RHLs, tanto a porção lipídica, quanto a porção glicídica, devem ser quantificadas. Os ácidos graxos presentes em RHLs foram avaliados utilizando a metodologia para análise de PHAs, descrita no item 4.9.3. No entanto, para análise e quantificação da ramnose produzida, uma nova metodologia foi desenvolvida e será descrita no item seguinte.

O DNA genômico desses cinco isolados bacterianos selecionados foi extraído e utilizado para amplificar fragmento correspondente a parte do DNAr 16S. O sequenciamento desses fragmentos revelou, para todos os cinco isolados, 97-99% de similaridade e 95-97% de identidade com o gênero *Pseudomonas*.

5.2.1 Padronização da metodologia para análise de ramnose

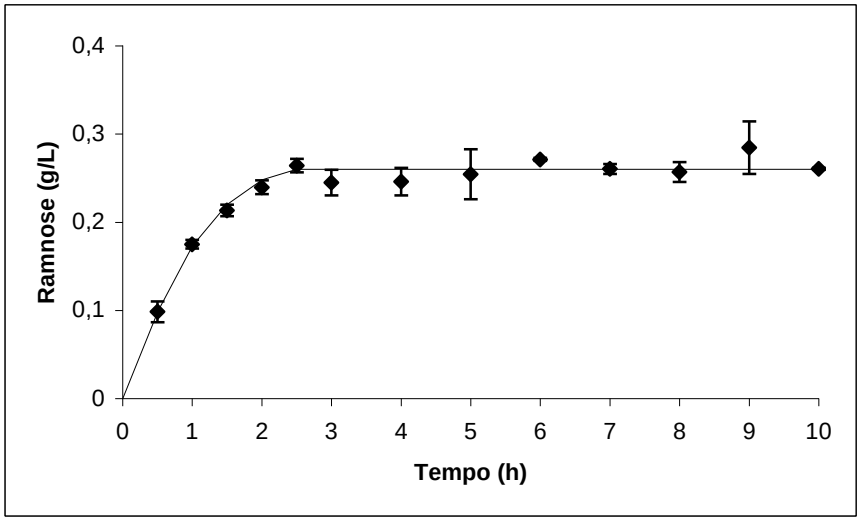
Os métodos usualmente utilizados para quantificação de ramnose (método do fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) ou do orcinol (CHANDRASEKARAN e BENMILLER, 1980)) são baseados em medidas espectrofotométricas dos derivativos de carboidratos (HEYD et al., 2008), assim, outros carboidratos presentes no sobrenadante, podem interferir na quantificação. Com o objetivo de avaliar a presença de ramnose no sobrenadante dos cultivos, uma nova metodologia foi estabelecida. Nos ramnolipídios, os carboidratos apresentam-se ligados a ácidos graxos, desta forma, a detecção depende de sua hidrólise prévia.

O isolado LFM 634 foi cultivado em meio mineral contendo glicose (cerca de 30 g/L) como fonte de carbono e sulfato de amônio (cerca de 1 g/L) como fonte de nitrogênio, nas condições adequadas para produção de elevadas quantidades de ramnolipídios. O biossurfactante produzido foi purificado seguindo a metodologia de COSTA et al. (2009a).

Com o ramnolipídio purificado, uma solução desse tensoativo foi preparada (cerca de 1 g/L) e submetida a hidrólise. Para tanto, a 1 mL da solução de ramnolipídios foram adicionados 100 μL de uma solução de H_2SO_4 (10M). Essa mistura foi aquecida a 98 ^oC em banho-seco por diferentes tempos, com o objetivo de identificar o tempo de hidrólise

adequado. Após retirada das amostras do banho-seco, estas eram resfriadas em banho de gelo e neutralizadas com 100 μL de NaOH (10M). As amostras foram filtradas em membranas 0,45 μm e injetadas em cromatógrafo líquido para detecção de ramnose, diferentes concentrações de ramnose foram utilizadas como padrão. Esse experimento foi realizado em triplicata, e os resultados estão representados na Figura 8.

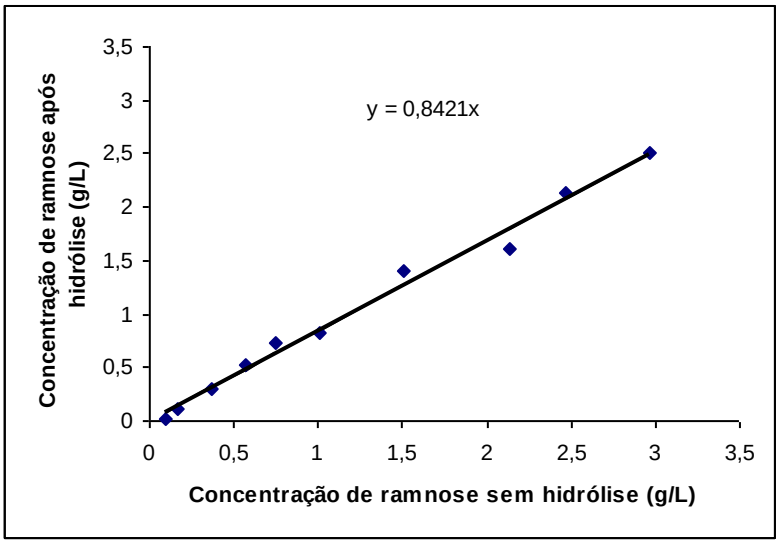
Figura 8 - Concentração de ramnose após diferentes tempos de hidrólise do ramnolipídio.



De acordo com os resultados obtidos, a partir de 3 horas já é possível visualizar uma estabilização na concentração de ramnose detectada. Esses resultados corroboram com os reportados por PEIXOTO (2008). Desta forma, o tempo de 5 horas parece ser suficiente para completar-se a hidrólise e possibilitar a análise de ramnose nos sobrenadantes dos cultivos realizados neste trabalho.

Com o objetivo de verificar se haveria perda de ramnose durante o processo de hidrólise dois lotes de soluções-padrão de ramnose foram preparados nas seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g/L. Apenas um destes lotes foi submetido à hidrólise ácida por 5 horas. A correlação entre as soluções que sofreram hidrólise e as soluções não submetidas a esse procedimento indicou que 84,2% da ramnose é recuperada após esse processo (Figura 9), desta forma essa porcentagem de recuperação foi utilizada para corrigir as quantificações de ramnose nas amostras de ramnolipídios hidrolisadas e analisadas neste estudo.

Figura 9 - Correlação entre a concentração de ramnose nas soluções que sofreram hidrólise e aquelas não submetidas a esse processo.

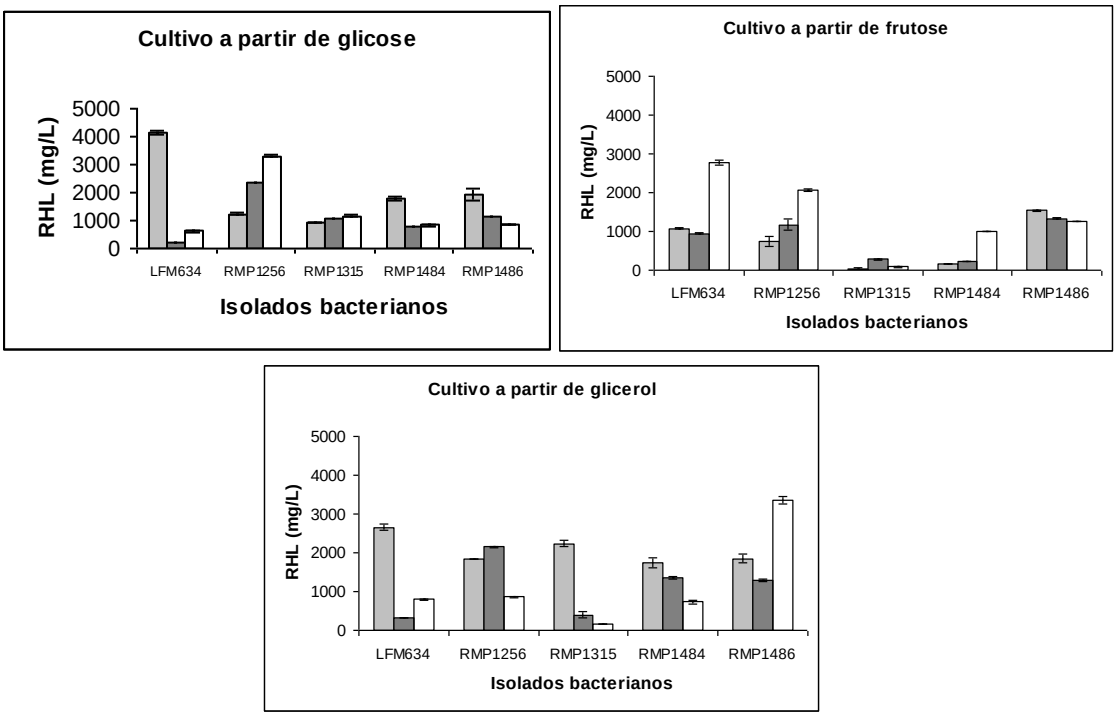


5.2.2 Avaliação da produção de RHLs

A análise dos cultivos realizados para produção de RHLs foi dividida em três etapas: produção de ramnolipídios a partir de (i) carboidratos ou glicerol (Figura 10); (ii) ácidos láurico ou octanoico (Figura 11); (iii) óleos vegetais (Figura 12).

Para os cultivos utilizando glicose, frutose ou glicerol (Figura 10), dois isolados (LFM634 e RMP1256) apresentaram valores de produção de RHLs superiores a 2000 mg/L em pelo menos uma das fontes de nitrogênio avaliadas. Nos cultivos utilizando sulfato de amônio, o isolado LFM634 demonstrou altos níveis de produção em meios contendo glicose ou glicerol. O isolado RMP1256 produziu maiores quantidades de RHLs a partir de glicose quando ureia foi suprida no meio de cultura. No entanto, a partir de nitrato de sódio este mesmo isolado também produziu quantidades expressivas de RHLs em cultivos com glicose e glicerol. Nos cultivos a partir de frutose, ureia demonstrou ser a melhor fonte de nitrogênio tanto para o isolado LFM 634, quanto para o isolado RMP 1256. Para outros dois isolado (RMP1315 e RMP1486), observou-se a produção de quantidades expressivas de RHLs (acima de 2000 mg/L), mas apenas no cultivo utilizando glicerol, como fonte de carbono.

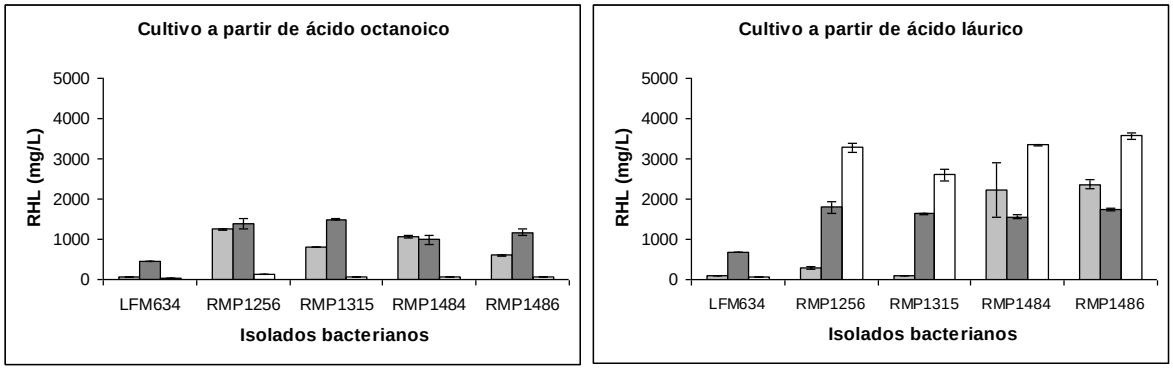
Figura 10 - Produção de ramnolipídios a partir de cultivos utilizando carboidratos ou glicerol.



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente.

Ácido octanoico não se mostrou uma fonte de carbono eficiente para a produção de ramnolipídios, visto que nenhum dos isolados apresentou produção acima de 2000 mg/L (Figura 11). Nos cultivos utilizando ácido láurico como fonte de carbono, foi observada a produção de RHLs correspondendo a mais que 2000 mg/L quando ureia foi suprida como fonte de nitrogênio, com exceção apenas do isolado LFM634, que produziu pequena quantidade de RHLs em qualquer das fontes de nitrogênio avaliadas. A baixa eficiência de produção de ramnolipídios a partir de ácido láurico pelo isolado LMF634 já era indicada nos testes qualitativos (Tabela 3). Quando sulfato de amônio foi suprido como fonte de nitrogênio, somente os isolados RMP1484 e RMP1486 apresentaram valores de produção de RHLs acima de 2000 mg/L. Estes resultados sugerem que ureia é a fonte de nitrogênio ideal para produção de RHLs a partir de ácido láurico, embora algumas linhagens não sejam capazes de utilizar essa fonte de carbono para produção desse composto tensoativo (Figura 11).

Figura 11 - Produção de ramnolipídios a partir de cultivos utilizando ácido láurico e ácido octanoico.



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente.

A Figura 12 apresenta a produção de RHLs para os cultivos utilizando óleos vegetais. Quando os óleos de tungue e mamona foram fornecidos, nenhum dos isolados foi capaz de produzir RHLs em concentrações expressivas (acima de 2000 mg/L). O que indica que não são bons precursores para a síntese desses tensoativos.

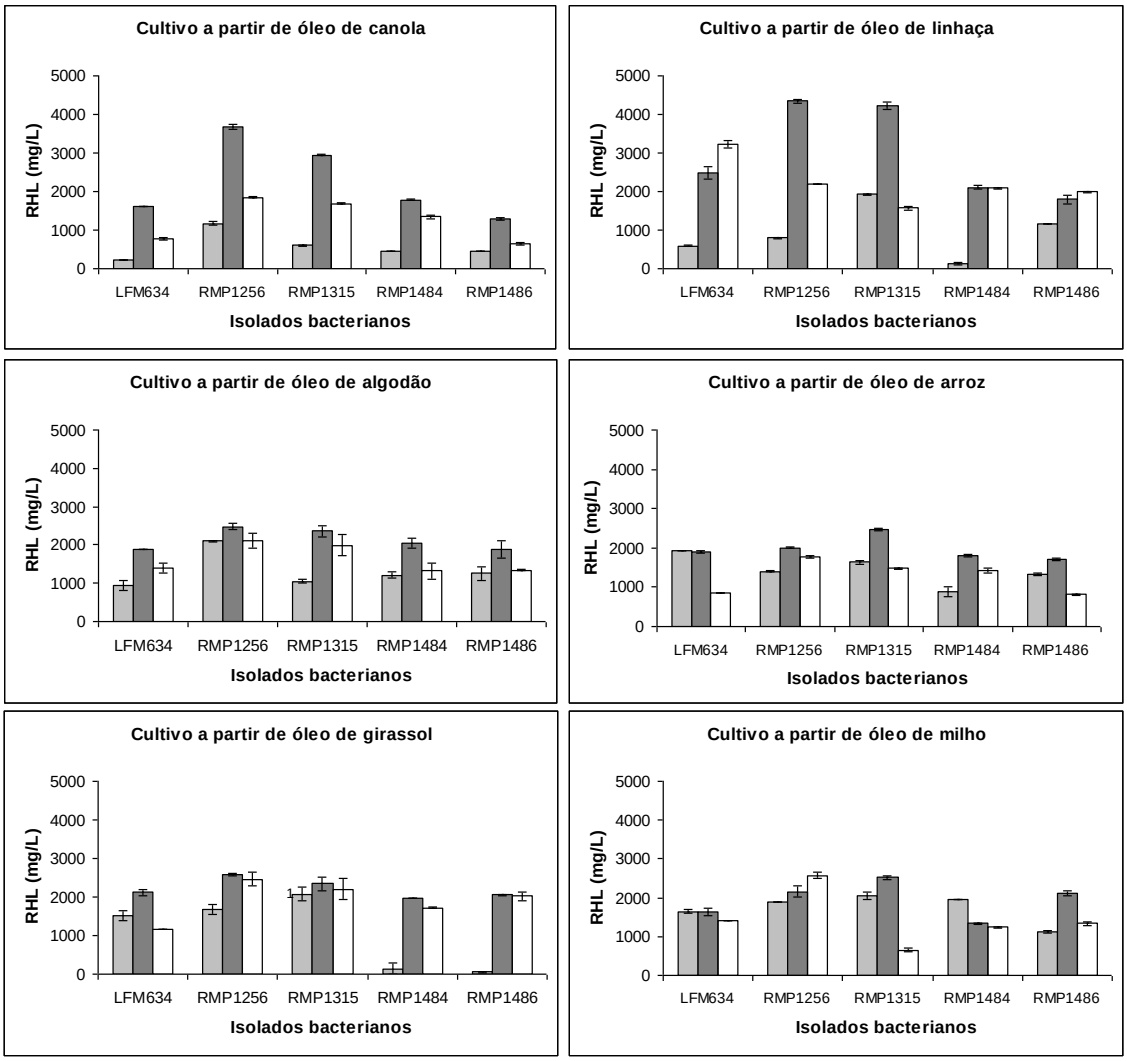
Os isolados RMP1256 e RMP1315 foram capazes de produzir quantidades expressivas de RHLs em todos os óleos avaliados em pelo menos uma das fontes de nitrogênio fornecida, com exceção dos óleos de tungue e mamona que não foram boas fontes de carbono para nenhum dos isolados.

Os óleos de canola e linhaça permitiram a produção de maiores concentrações de RHLs. O isolado RMP1256 atingiu mais que 3500 mg/L em óleo de canola e nitrato. Em óleo de linhaça, os isolados RMP1256 e RMP1315 atingiram concentrações de RHLs superiores a 4000 mg/L quando nitrato foi suprido.

Em geral, nitrato foi a fonte de nitrogênio que promoveu a produção de maior quantidade de ramnolipídios, quando óleos vegetais foram supridos como fonte de carbono. Entretanto, esta não pode ser considerada uma regra geral, pois em alguns cultivos a utilização de ureia levou a formação de maiores quantidades de RHLs (Figura 12).

Figura 12 - Produção de ramnolipídios a partir de cultivos utilizando óleos vegetais.

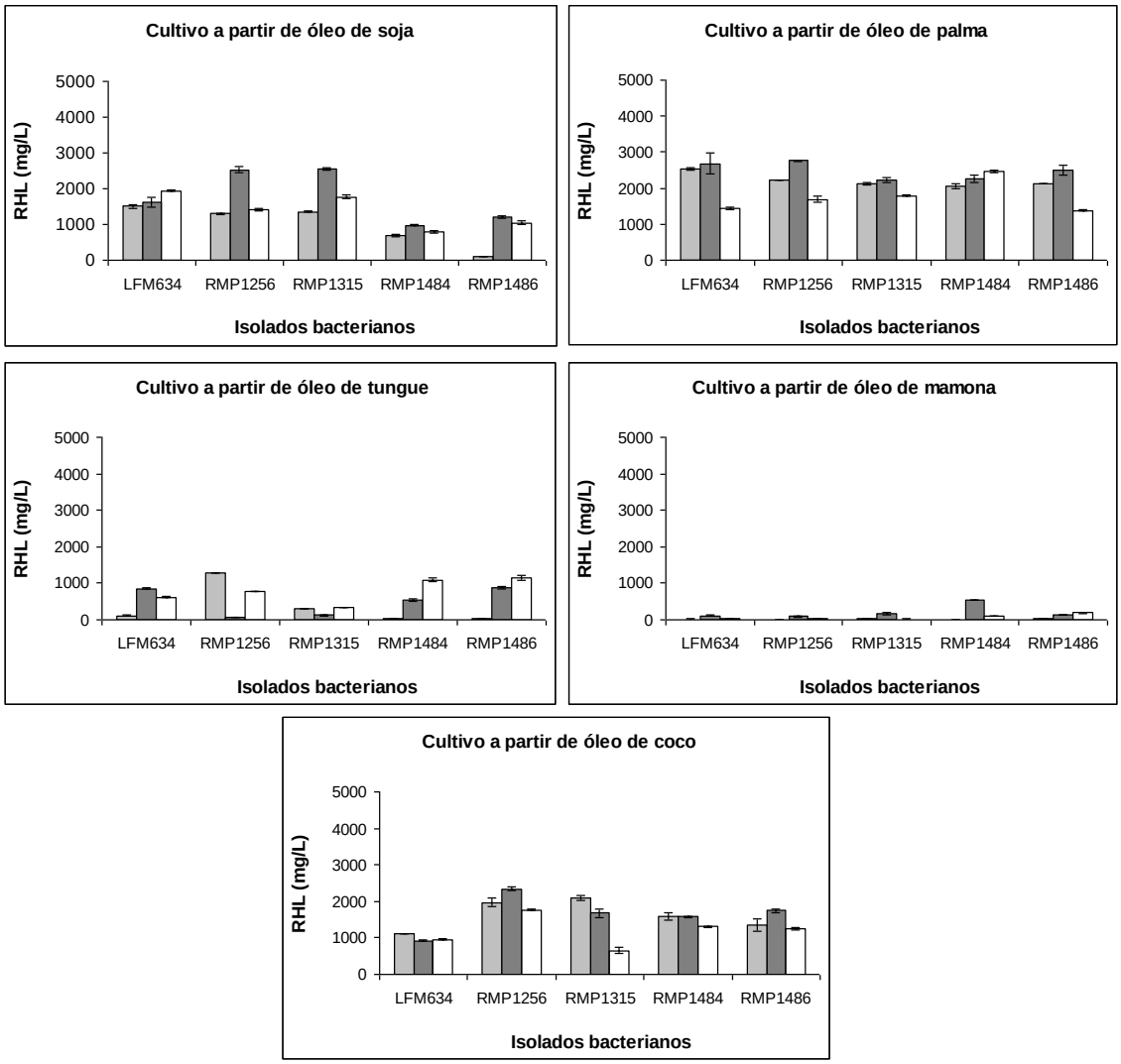
(continua)



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente.

Figura 12 - Produção de ramnolipídios a partir de cultivos utilizando óleos vegetais.

(conclusão)



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente.

Os resultados desse estudo demonstraram que óleo de linhaça e óleo de canola foram as fontes de carbono hidrofóbicas que promoveram a formação de maiores quantidades de ramnolipídios (>3500 mg/L). A glicose foi a única fonte de carbono hidrofílica que permitiu a produção de altas quantidades desse tensoativo, mesmo assim, essa situação só foi observada para o isolado LFM634, quando cultivado em sulfato de amônio. MATA-SANDOVAL et al. (2001), trabalhando com uma linhagem de *P. aeruginosa* UG2, observaram que substratos hidrofóbicos promovem formação de maiores quantidades de RHLs quando comparados a substratos hidrofílicos. COSTA et al. (2009b) observaram que a produção de RHLs variava dependendo da fonte de carbono e da linhagem bacteriana avaliada.

COSTA et al. (2006) cultivaram a linhagem *P. aeruginosa* LBI em diferentes óleos brasileiros e atingiram valores da ordem de 9900 mg/L quando óleo de castanha-do-pará era

fornecido como fonte de carbono. No entanto, as condições de cultivo eram diferentes das utilizadas neste trabalho, uma vez que o meio de cultura continha mais fonte de carbono (2% (w/v)) e a análise foi realizada após 120 horas de cultivo. WEI et al. (2005) reportaram que as concentrações de ramnolipídios produzidas por *P. aeruginosa* J4 aumentaram quando as concentrações de óleos vegetais foram aumentadas de 20 para 100 mL/L, entretanto, o período de cultivo de seus experimentos foram aumentados de 7 para 10 dias. SILVA et al. (2010) observaram os maiores valores de concentração de RHLs após 96h de cultivo quando avaliaram a produção desse composto por *P. aeruginosa* UCP0992 a partir de glicerol. Desta forma, aumentando-se a concentração de óleo vegetal fornecida, bem como tempo de cultivo, espera-se atingir maiores concentrações de RHLs utilizando as linhagens bacterianas deste estudo.

Em geral, nos cultivos utilizando óleos vegetais, nitrato de sódio se mostrou uma fonte de nitrogênio interessante para produção de grandes quantidades de ramnolipídios. SILVA et al. (2010) avaliaram a produção de ramnolipídios a partir de glicerol, utilizando diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, ureia, sulfato de amônio, peptona, nitrato de amônia, milhocina e extrato de levedura) e o nitrato de sódio foi o que melhor promoveu a produção de ramnolipídios. PIETRO et al. (2008) também consideraram nitrato de sódio como melhor fonte de nitrogênio para produção de RHLs quando avaliaram a produção pela linhagem de *P. aeruginosa* LBM10.

Segundo alguns autores (KÖHLER et al., 2000; MULLIGAN e GIBBS, 1989; VAN ALST et al., 2007; VENKATA RAMANA e KARANTH, 1989), a produção de ramnolipídios é inibida na presença de amônia; glutamina, asparagina e arginina como fontes de nitrogênio e promovida na presença de nitrato, glutamato e aspartato. Muitos trabalhos demonstram que nitrato é a melhor fonte de nitrogênio para a produção de RHLs (VENKATA RAMANA e KARANTH 1989; MANRESA et al., 1991; ARINO et al., 1996) e provoca maior expressão de *rhlAB* em comparação com amônia (DÉZIEL et al., 2003). Porém a base pela preferência por nitrato ainda não é conhecida, uma sugestão foi que *P. aeruginosa* esteja usando nitrato como um aceptor final de elétrons mesmo na presença de oxigênio (MANRESA et al., 1991). SABRA et al. (2002) propuseram que *P. aeruginosa* produz ramnolipídios para reduzir as taxa de transferência de oxigênio como forma de se proteger de estresses oxidativos, e parece que esse mecanismo é ativado por deficiência de ferro (KIM et al., 2003). Entretanto, excelentes produções de RHLs também são obtidas na ausência de oxigênio (CHAYABUTRA et al. 2001). VAN ALST et al. (2007) sugeriram que NO (óxido nítrico) promove maior expressão de *rhlAB*. Eles observaram que mutantes *nar* (região

codificadora da enzima nitrato redutase transmembrânica) e *nir* (gene codificador da enzima nitrito redutase) diminuíam consideravelmente a produção de RHLs, porém quando inativaram o gene *nor* (responsável pela síntese de óxido nítrico redutase) e *nap* (região que codifica para a enzima nitrato redutase periplasmática) essa diminuição não foi observada.

Assim, os resultados deste trabalho e da literatura em conjunto sugerem que a produção de ramnolipídios é dependente da linhagem bacteriana e não pode ser claramente vinculada às fontes de carbono ou nitrogênio fornecidas. Processos de produção deverão, portanto, ser estabelecidos considerando a combinação linhagem/fonte de carbono/fonte de nitrogênio. Por exemplo, considerando glicose como a fonte de carbono para produção de RHLs, o ideal seria utilizar o isolado LFM634 e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Por outro lado, se a fonte de carbono for rica em triglicérides (óleos vegetais), os isolados de escolha seriam RMP1256 ou RMP1315 utilizando nitrato como fonte de nitrogênio.

5.2.3 Composição dos RHLs produzidos

A análise da composição dos 3-hidroxiácidos (3HAs) detectados em ramnolipídios indicou que o 3-hidroxidecanoato (3HD) foi o principal constituinte, correspondendo a mais que 60 mol% nos cultivos que apresentaram produção de 3HAs superior a 300 mg/L, exceto nos cultivos do isolado LFM634 em ácido láurico e nitrato, bem como do isolado RMP1256 em óleo de linhaça e sulfato de amônio (anexo A). Essa detecção ressalta a alta especificidade da enzima RhlA, em utilizar principalmente o 3HD como substrato, como já reportado na literatura (CHOI et al., 2010; ZHU e ROCK, 2008).

Nos cultivos utilizando óleos vegetais que continham em sua composição mais de 9% de ácido linoleico (algodão, arroz, canola, girassol, linhaça, milho, palma, soja e tungue), foi detectada a presença de 3-hidroxi-6-dodecenoato ($3HDd\Delta_6$) nos sobrenadantes. O $3HDd\Delta_6$ não pode ser produzido na biossíntese de ácidos graxos, mas é o resultado da β-oxidação do ácido linoleico. Assim, este resultado sugere que a β-oxidação de ácidos graxos deve estar contribuindo direta ou indiretamente para a biossíntese de ramnolipídios, ao contrário do proposto na literatura (ZHU e ROCK, 2008).

Quando óleo de mamona foi suprida como fonte de carbono, um pico diferente foi detectado em altas concentrações com tempo de retenção de 15.0 min (Figura 13). O óleo de mamona apresenta em sua composição altas concentrações do ácido ricinoleico, a β-oxidação desse ácido graxo poderia gerar o ácido 4-hidroxidecanoico, um composto ainda não descrito como constituinte em RHLs. Para confirmação da presença deste composto, o RHL produzido

a partir do cultivo utilizando o isolado LFM634, foi purificado e analisado por CG (Figura 13) e CG-MS (Figura 14).

Figura 13 - Análise por cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3HAs presentes em RHLs produzido pelo isolado LFM634 a partir de óleo de mamona.

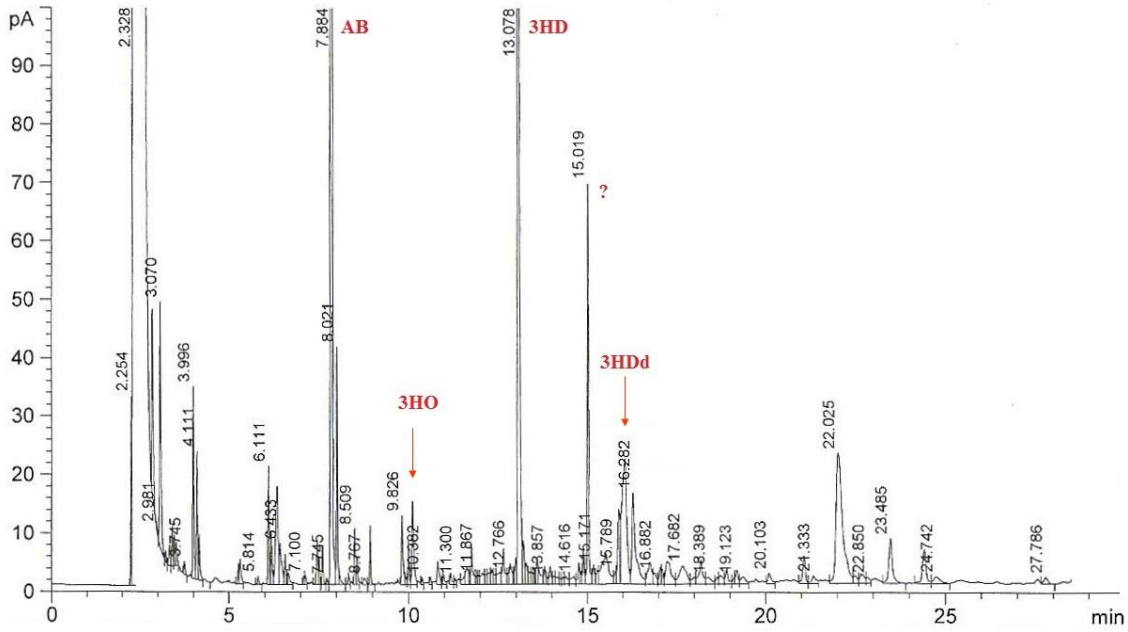
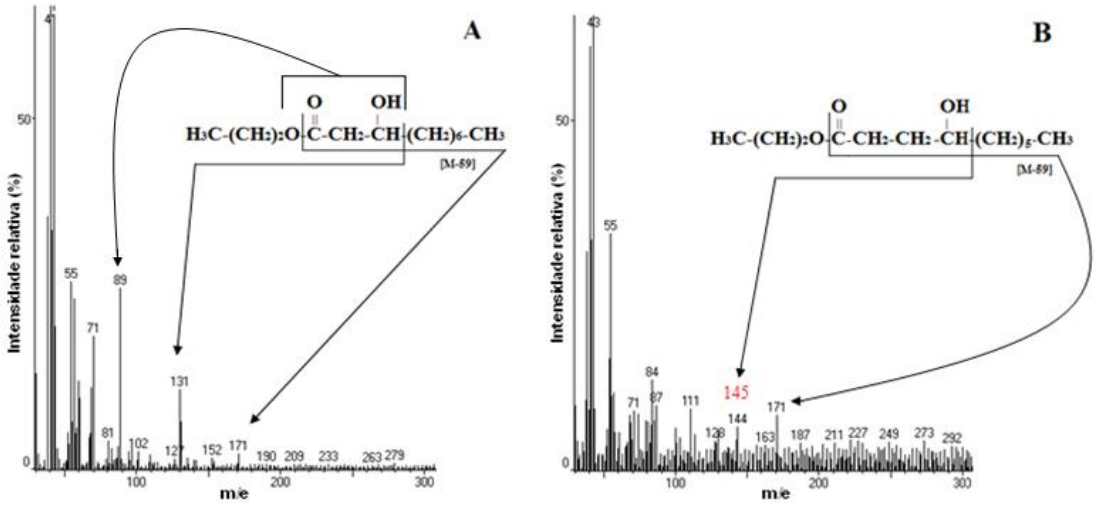


Figura 14 - Espectros de massas de propil-ésteres de 3HAs do RHL purificado a partir do ensaio utilizando óleo de mamona.



A) Espectro de massa do 3-hidroxidecanoato; B) Espectro de do composto detectado em CG no tempo de 15.019 min.

A análise de espectrometria de massas não permitiu concluir que o composto detectado nos RHLs produzidos a partir de óleo de mamona corresponde ao 4-

hidroxidecanoato. O fragmento [M-59] com m/e de 171 foi detectado, entretanto, o fragmento correspondente a clivagem alfa do grupo hidroxil, que deveria apresentar m/e de 145 não foi detectado, embora um fragmento com m/e de 144 foi detectado. Uma vez que nas bibliotecas de espectros de massas não foram detectados padrões para o propil-éster do ácido 4-hidroxidecanoico e que a interpretação do espectrograma não foi conclusiva, será necessária a obtenção de um padrão desse composto para uma análise mais conclusiva.

A relação 3HA/Ramnose (3HA/Ram) foi calculada a fim de estabelecer correlações entre o tipo de ramnolipídio produzido e as fontes de nitrogênio ou carbono fornecidas. Analisando as estruturas apresentadas na Figura 1, teríamos para RL1, RL2, RL3 e RL4, valores de 3HA/Ram, respectivamente, de 1, 2, 0,5 e 1. Além desses componentes, também podem estar presentes os ácidos 3-(3-hidroxialcanoiloxi)-alcanoicos, que contribuem para aumentar o valor da relação 3HA/Ram. Desta forma, os valores de 3HA/Ram podem variar de 0,5 até valores muito grandes dependendo da quantidade dos diferentes componentes. Claramente, a relação 3HA/Ram aponta para relação entre os componentes hidrofílico (ramnose) e hidrofóbico (3HA), que podem interferir nas propriedades tensoativas do biossurfactante (NITSCHKE et al., 2005a). Um melhor entendimento da contribuição individual de cada componente de RHL para a propriedade surfactante possibilitaria a produção de RHLs com propriedades desejáveis para usos específicos. A maioria dos trabalhos nos quais a composição dos RHLs foi avaliada, considerou apenas o tipo de RHL produzido, não levando em consideração os 3HAAs também gerados. O cálculo da relação 3HA/Ram realizado neste estudo, além de estimar a predominância de um tipo de RHL para cada cultivo avaliado, considera também a formação dos 3HAAs.

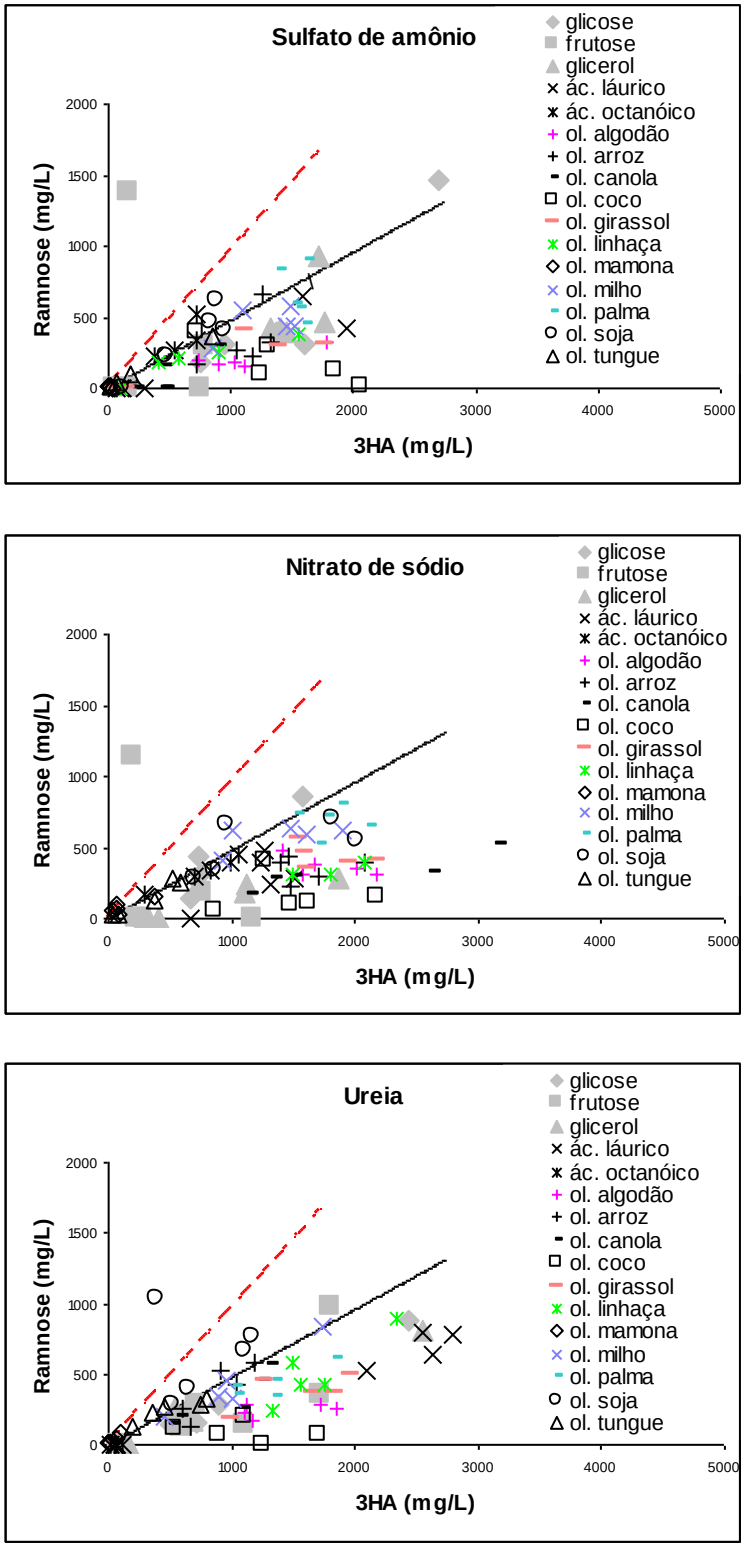
Em geral, observou-se valores altos de 3HA/Ram, sugerindo que além de mono e di-ramnolipídios, uma importante parcela de 3HAAs constitui os compostos tensoativos produzidos. Para melhor avaliar a interferência da fonte de carbono ou nitrogênio na composição de RHLs a correlação entre a concentração de ramnose e 3HA foi avaliada. A partir desses valores não foi possível estabelecer qualquer relação entre a fonte de nitrogênio e a relação 3HA/Ram (Figura 15). Com relação às fontes de carbono fornecidas foi possível fazer algumas observações (Figura 16).

Segundo alguns autores (DÉZIEL et al., 1999; NITSCHKE et al., 2005b; RAZA et al., 2009), a predominância de um tipo de ramnolipídio varia de acordo com a fonte de carbono utilizada. Quando *P. aeruginosa* LBI foi cultivada em substratos hidrofílicos, tais como glicerol ou glicose, o di-ramnolipídio era predominante, ao passo que em substratos hidrofóbicos o homólogo de mono-ramnolipídio predominava (NITSCHKE et al. 2005b). Um

estudo mais recente desse grupo (NITSCHKE et al., 2010) avaliou a produção de ramnolipídios a partir de resíduos de óleo de soja, eles notaram que ao longo do cultivo a composição dos homólogos de ramnolipídios variava e, ao término do ensaio (144 h), o mono-ramnolipídio era o constituinte predominante . COSTA et al. (2006) cultivaram a mesma linhagem bacteriana com diferentes óleos vegetais brasileiros e identificaram a predominância de di-ramnolipídios. Essas diferenças nos tipos de ramnolipídios observados podem resultar da composição da fonte de carbono ou, mais provavelmente, das específicas condições de cultivo (COSTA et al., 2006). SYLDATK et al. (1985) afirmaram que as condições ambientais podem também afetar a distribuição dos homólogos de ramnolipídios. Em contrapartida, MATA-SANDOVAL et al. (2001) observaram que *P. aeruginosa* UG2 produziu misturas de ramnolipídios com composição similar independente do substrato utilizado como fonte de carbono.

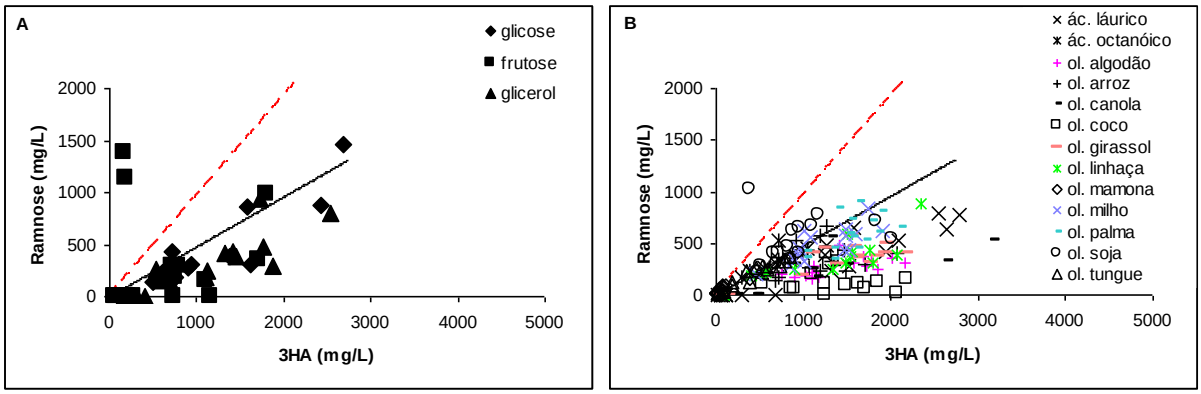
De acordo com a Figura 16, tantos nos cultivos utilizando substratos hidrofílicos quanto nos que utilizaram substratos hidrofóbicos, o mono-ramnolipídio foi predominante, uma vez que a maioria dos pontos está mais próxima da linha correspondente a este tipo de RHL. Entretanto, substratos hidrofóbicos, parecem favorecer a maior formação de 3HAAs, pois nesses cultivos há situações em que se observou baixa produção de ramnose e elevadas produções de 3HAs. Essa maior produção de 3HAs a partir de óleos vegetais já havia sido detectada antes por STRELEC (2006). As maiores concentrações de ramnose foram observadas a partir de carboidratos, sugerindo que substratos hidrofílicos favorecem a produção de ramnose quando comparados aos substratos hidrofóbicos.

Figura 15. Correlação entre a concentração de ramnose e 3HAs presentes em RHLs a partir das diferentes fontes de nitrogênio fornecidas.



A linha tracejada (vermelha) indica os valores esperados para di-ramnolipídios, e a linha contínua (preta) indica os valores esperados para mono-ramnoliopídios. Esses valores foram calculados considerando a massa molar de di-ramnolipídios e mono-ramnolipídios contendo como 3-hidroxiácidos apenas o 3-hidroxidecanoato.

Figura 16. Correlação entre a concentração de ramnose e 3HAs presentes em RHLs a partir das diferentes fontes de carbono fornecidas.



A) fontes de carbono hidrofílicas e B) fontes de carbono hidrofóbicas. A linha tracejada (vermelha) indica os valores esperados para di-ramnolipídios, e a linha contínua (preta) indica os valores esperados para mono-ramnoliopídios. Esses valores foram calculados considerando a massa molar de di-ramnolipídios e mono-ramnolipídios contendo como 3-hidroxiácidos apenas o 3-hidroxidecanoato.

5.2.4 Avaliação da produção de PHAs

Em geral, a concentração de PHAs produzidos não ultrapassou o valor de 2000 mg/L, exceto para os isolados RMP1484 quando cultivado com óleo de palma e sulfato de amônio e RMP1486 quando cultivado com óleo de milho e sulfato de amônio (Figura 19). MARSUDI et al. (2008) reportaram que óleo de palma favoreceu a produção de polihidroxialcanoatos quando avaliaram a produção simultânea de RHLs e PHAs por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, para os resultados obtidos nesse estudo, tanto RHLs quanto PHAs foram produzidos em quantidades semelhantes. Além disso, essa alta produção de PHAs a partir de óleo de palma, não foi observada por nenhum outro isolado avaliado.

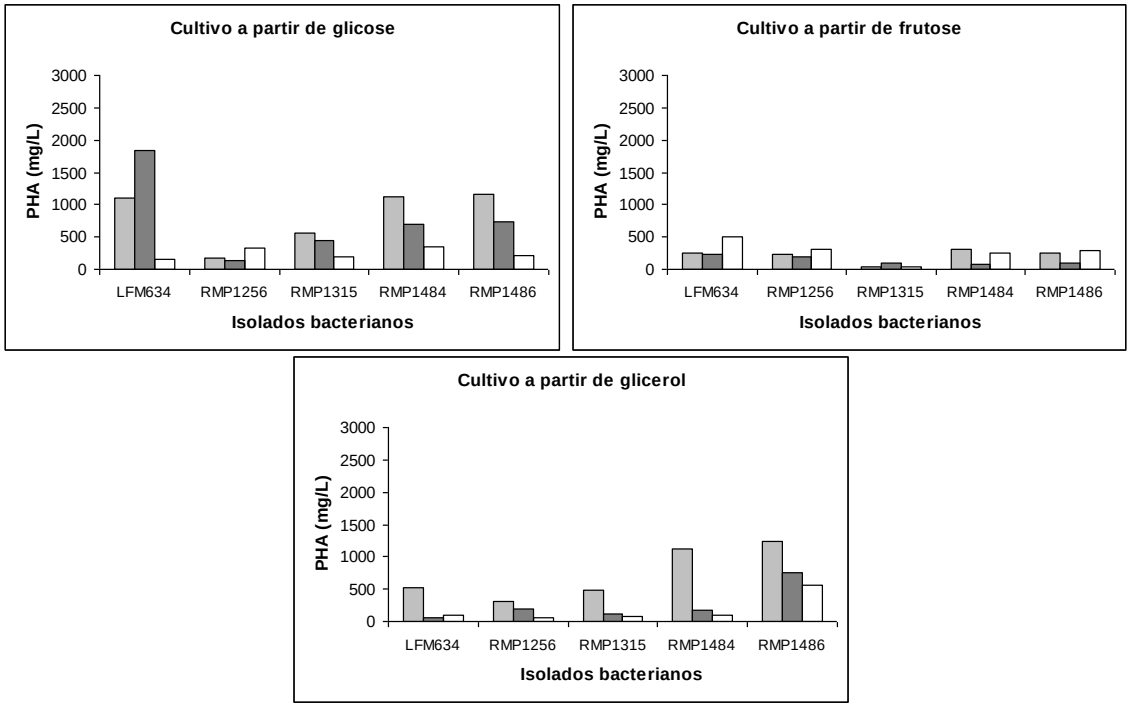
Nos cultivos utilizando carboidratos ou glicerol, apenas o isolado LFM634 apresentou produção de PHAs acima de 1500 mg/L, porém apenas quando cultivado com glicose e nitrato de sódio (Figura 17).

Nenhum dos isolados bacterianos apresentou expressiva produção de PHAs (acima de 1500 mg/L) a partir de ácidos láurico e octanoico (Figura 18).

Para os cultivos utilizando óleos vegetais, apenas algumas situações atingiram valores de produção de PHAs acima de 1500 mg/L: isolados LFM634 e RMP1484 com óleo de girassol, RMP1486 com óleo de milho ou algodão, RMP1484 e RMP1486 com óleo de canola e RMP1484 com óleo de arroz (Figura 19).

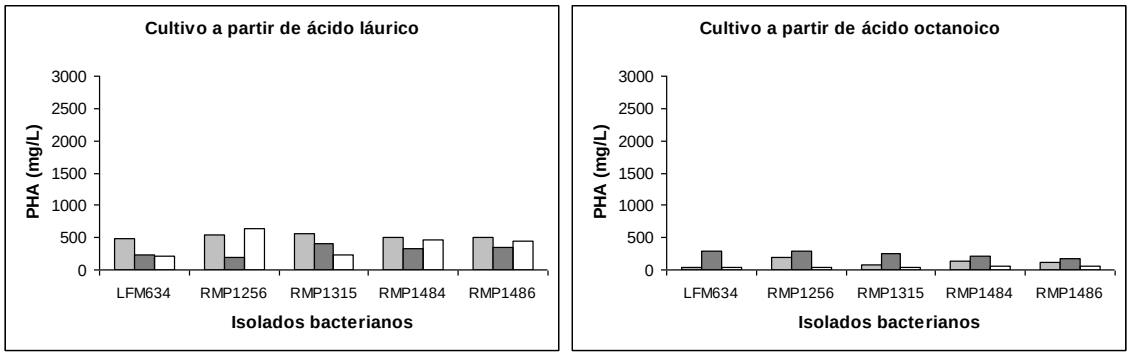
Sulfato de amônio se mostrou a melhor fonte de nitrogênio para produção de PHAs. Em geral essa foi a fonte de nitrogênio que promoveu a produção de maiores quantidades de PHAs (acima de 1500 mg/L), com exceção apenas do isolado LFM634 cultivado com glicose.

Figura 17. Produção de polihidroxialcanoatos a partir de cultivos utilizando carboidratos ou glicerol.



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente.

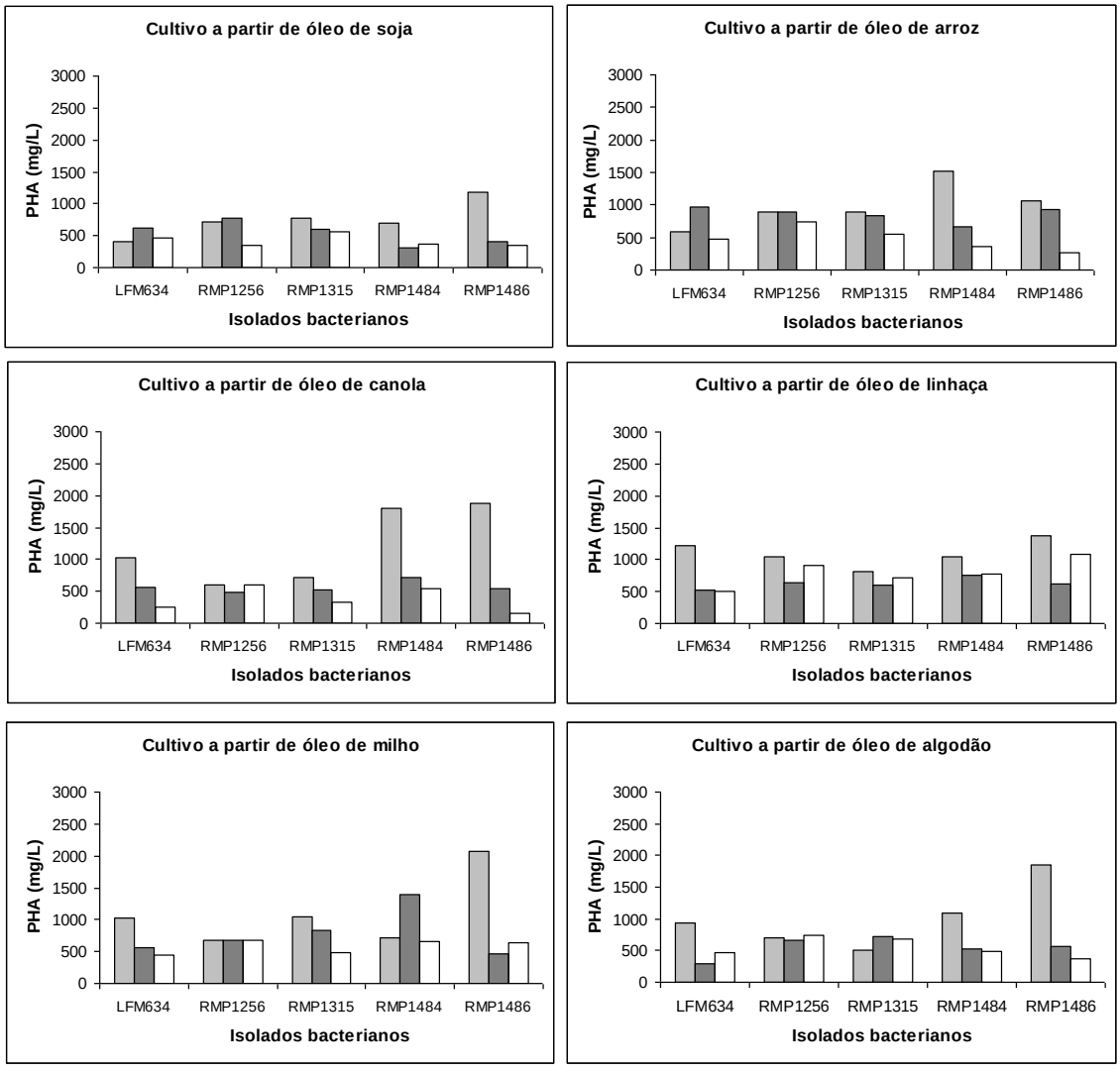
Figura 18. Produção de polihidroxialcanoatos a partir de cultivos utilizando ácidos láurico e octanoico.



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente.

Figura 19. Produção de polihidroxialcanoatos a partir de cultivos utilizando óleos vegetais.

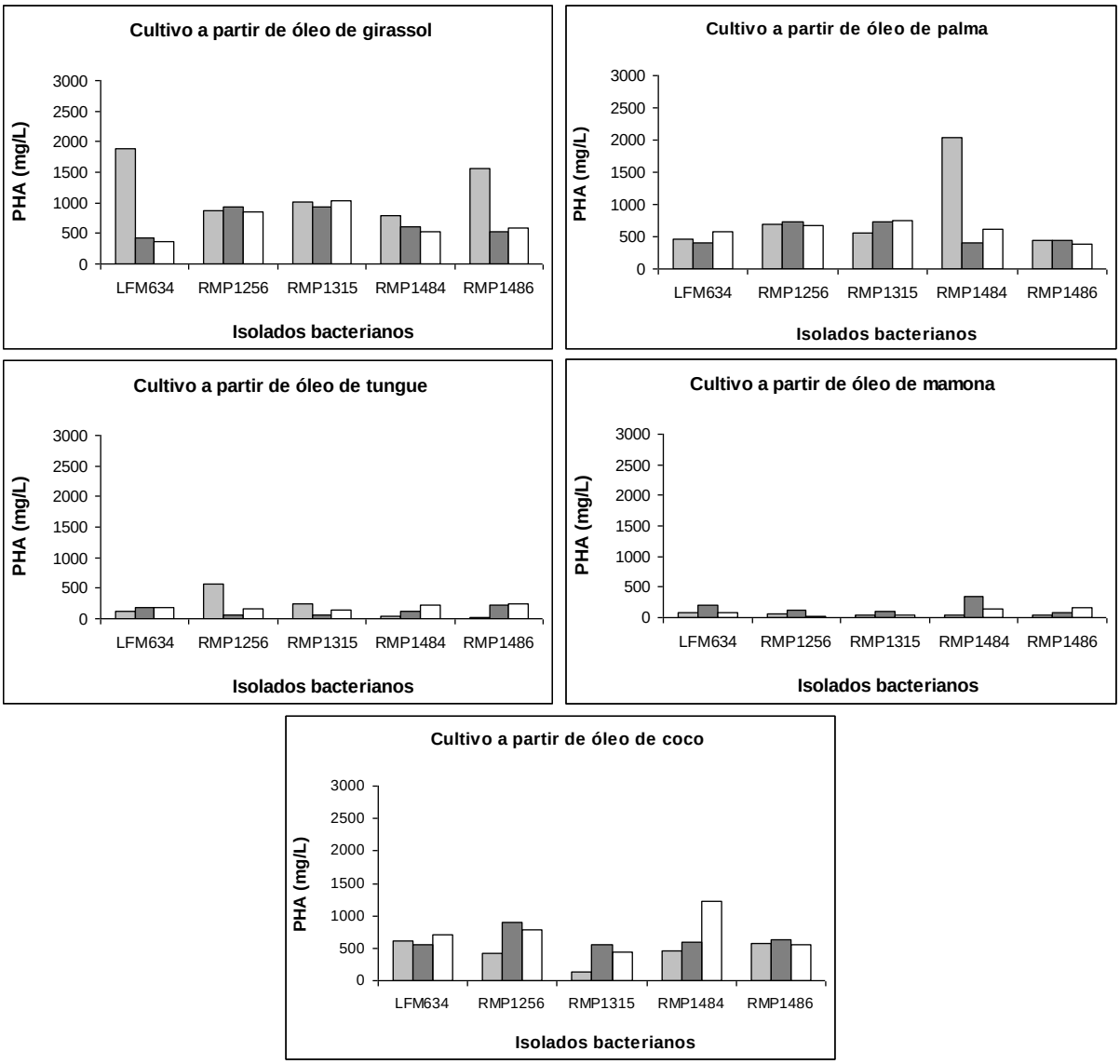
(continua)



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente.

Figura 19. Produção de polihidroxialcanoatos a partir de cultivos utilizando óleos vegetais.

(conclusão)



Resultados em cinza claro, cinza escuro e branco representam cultivos com sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia, respectivamente (conclusão).

AVILA-LEÓN et al. (2007) avaliaram a produção de PHAs por duas linhagens de *Pseudomonas* utilizando esses mesmos óleos vegetais. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* IPT171 não foi capaz de produzir quantidades expressivas de PHA com nenhuma das fontes de carbono avaliada. Já a linhagem *Pseudomonas* sp. IPT046 foi capaz de produzir quantidades expressivas de PHAs (acima de 2000 mg/L) a partir de três fontes de carbono avaliadas, óleos de linhaça, coco e palma. Os resultados reportados por AVILA-LEÓN et al. (2007) corroboram os resultados obtidos nesse trabalho. A produção de PHAs foi dependente da linhagem bacteriana, visto que nem todos os isolados foram capazes de produzir elevadas quantidades de PHAs mesmo naquelas fontes de carbono que promoveram a maior formação de PHAs (óleo de palma e milho). Além disso, alta produção de PHAs foi observada a partir

de óleo de palma (isolado RMP1484 cultivado com sulfato de amônio), entretanto para os óleos de linhaça e coco essa elevada produção não foi observada. Futuras análises podem ser realizadas para avaliar se misturas de óleos podem melhorar a produção de PHAs por esse isolado, por exemplo, a adição de óleos de linhaça e coco, ao cultivo a partir de óleo de palma.

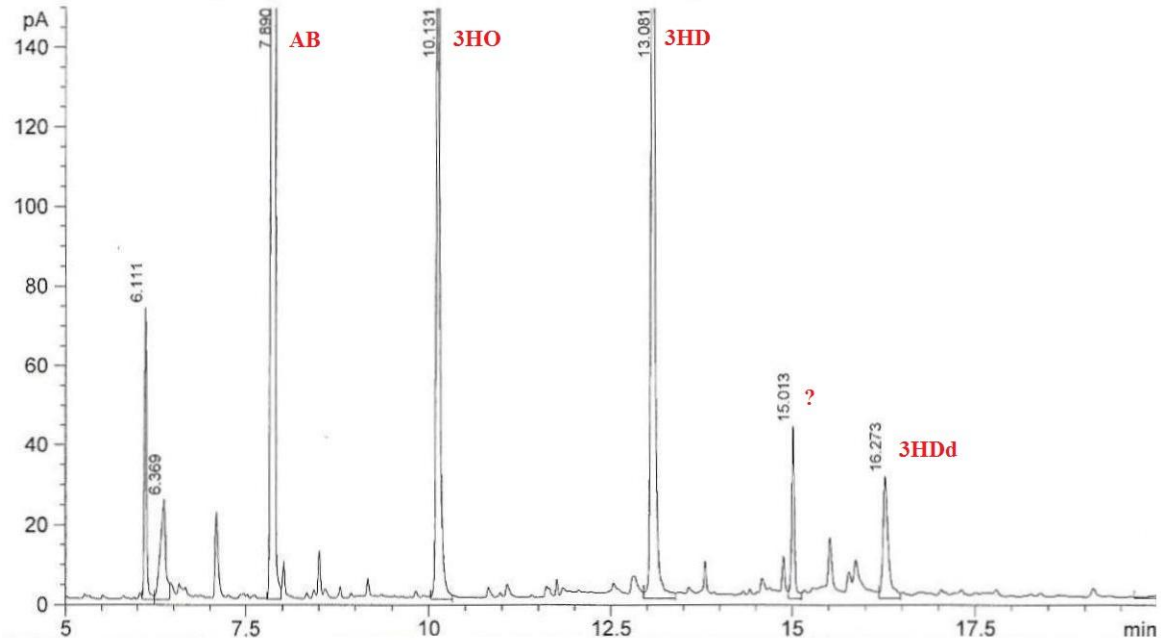
Desta forma, esses resultados indicam que a produção de PHAs não está vinculada a fonte de carbono e nitrogênio, pois mesmo aquelas fontes que promoveram maiores valores de produção de PHAs, não permitiram essa alta produção para todos os isolados avaliados. Indicando que assim como para RHLs, a produção de PHAs é específica para cada linhagem bacteriana.

5.2.5 Composição dos PHAs produzidos

Quando carboidratos e glicerol foram supridos como fonte de carbono, o principal constituinte em polihidroxialcanoatos foi o 3-hidroxidecanoato (3HD) correspondendo a mais de 60% em todos os cultivos nos quais o polímero produzido atingia concentrações acima de 10% da massa seca celular (MSC). Nos cultivos utilizando ácidos graxos e óleos vegetais, o 3HD também foi o principal constituinte (aproximadamente 50%) nos ensaios em que se observava formação de PHAs acima de 10% da MSC, no entanto, uma importante parcela de 3-hidroxioctanoato (3HO) também foi detectada (aproximadamente 35%), com exceção apenas do cultivo utilizando ácido octanoico, no qual o 3HO foi o principal constituinte (Anexo A).

Nos cultivos utilizando óleo de mamona, o mesmo pico detectado em RHLs com tempo de retenção de 15.0 min, também foi observado no PHA produzido (Figura 20). Como já mencionado, esse pico poderia corresponder ao propil-éster do ácido 4-hidroxidecanoato, um composto que provavelmente foi detectado em pequena quantidade no PHA produzido por *P. aeruginosa* 44T1 a partir de óleo de mamona (EGGINK et al., 1995). Para confirmação da presença deste composto em PHAs, análises de CG-MS devem ser realizadas utilizando um padrão do propil-éster do ácido 4-hidroxidecanoico para sua melhor identificação.

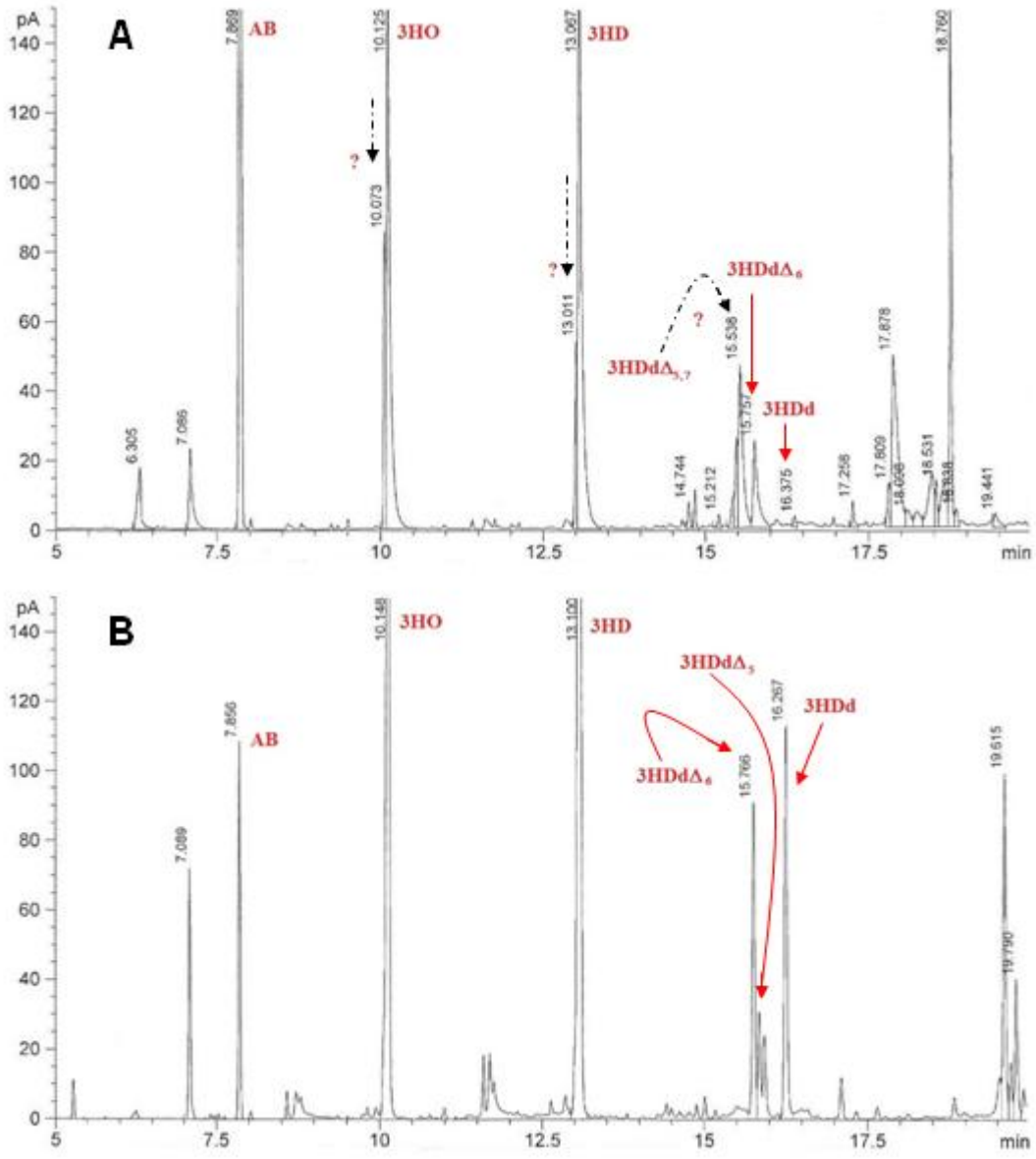
Figura 20 - Análise por cromatografia gasosa de células liofilizadas do isolado LFM634 cultivado com óleo de mamona.



Para os cultivos utilizando óleo de tungue, as análises de cromatografia gasosa revelaram um perfil de picos diferente. Dois picos não detectados em nenhum outro cultivo foram observados a partir dessa fonte de carbono: um pico anterior ao 3-hidroxioctanoato e outro anterior ao 3-hidroxidecanoato. Essa proximidade dos picos aos monômeros 3HO e 3HD sugere que esses dois picos diferentes podem corresponder a 3HAs contendo 8 (C8) e 10 (C10) carbonos com insaturações. Somente o óleo de tungue apresenta em sua composição o ácido α-eleosteárico (cerca de 40%) e a β-oxidação desse ácido graxo poderia gerar monômeros insaturados de 3HD e 3HO, o 3-hidroxi-3,5-decenoato ($3HD\Delta_{3,5}$) e o 3-hidroxi-3-octenoato ($3HO\Delta_3$). A análise de cromatografia gasosa do PHA purificado confirmou a presença dos picos que devem corresponder a esses compostos (Figura 21A), visto que em PHAs provenientes de outros cultivos esses picos não foram identificados (Figura 21B). Análises complementares, como cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas devem ser realizadas para a confirmação dessa hipótese, embora será necessário obter condições que permitam uma melhor resolução dos dois picos. Além desses dois compostos, um pico próximo a região do C12 (monômero com 12 carbonos) foi detectado na análise do polímero purificado. AVILA-LEÓN et al. (2007) analisaram a produção de PHAs por linhagens de *Pseudomonas* a partir de óleo de tungue e também identificaram um diferente pico próximo a essa região. Eles reportaram que esse pico poderia corresponder ao 3-hidroxi-

5,7-dodecenoato (3HDd$\Delta_{5,7}$) pois este seria um composto proveniente da β-oxidação do ácido α-eleosteárico (Figura 21A).

Figura 21. Análise por cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3HAs presentes em PHAs produzidos pelo isolado RMP1256.



A) Cromatograma proveniente da análise do PHA produzido a partir de óleo de tungue; B) Cromatograma proveniente da análise do PHA produzido a partir de óleo de linhaça. As setas pretas pontilhadas indicam a localização dos diferentes picos detectados. AB: padrão-interno, ácido benzoico; 3HO: 3-Hidroxioctanoato; 3HD: 3-hidroxidecanoato; 3HDd: 3-hidroxidodecanoato; 3HDdΔ_5: 3-hidroxi-5-dodecenoato; 3HDdΔ_6: 3-hidroxi-6-dodecenoato; 3HDd$\Delta_{5,7}$: 3-hidroxi-5,7-dodecenoato.

5.2.6 Correlação entre a produção de RHLs e PHAs

Com o objetivo de avaliar as inter-relações metabólicas da produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos foi analisada a correlação entre a concentração de RHLs e de PHAs

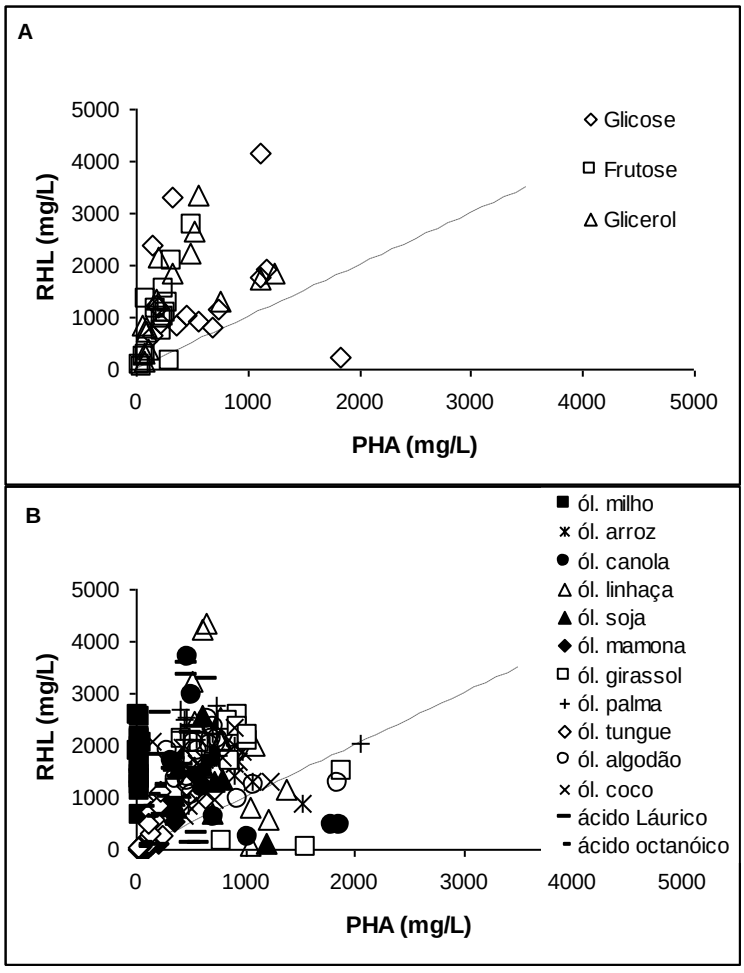
detectada, considerando as diferentes fontes de carbono (Figura 22) e as diferentes fontes de nitrogênio (Figura 23).

Como se observa, não foi possível estabelecer uma correlação clara entre as concentrações de RHLs e PHAs, ou seja, não se observa claro aumento de um desses quando o outro aumenta ou reduz. Entretanto, algumas observações podem ser realizadas a partir das Figuras 22 e 23.

Tanto fontes de carbono hidrofílicas quanto hidrofóbicas parecem favorecer a formação de RHLs, embora em muitas situações observou-se uma maior produção de PHAs em relação à produção de RHLs quando fontes de carbono hidrofóbicas foram fornecidas (Figura 22B).

MARSUDI et al. (2008) avaliaram a produção simultânea de PHAs e RHLs fornecendo óleo de palma, ácido oleico ou glicerol. A quantidade de polihidroxialcanoatos foi superior a de ramnolipídios nos cultivos utilizando óleo de palma ou ácido oleico. Por outro lado, glicerol foi um melhor precursor para a biossíntese de ramnolipídios.

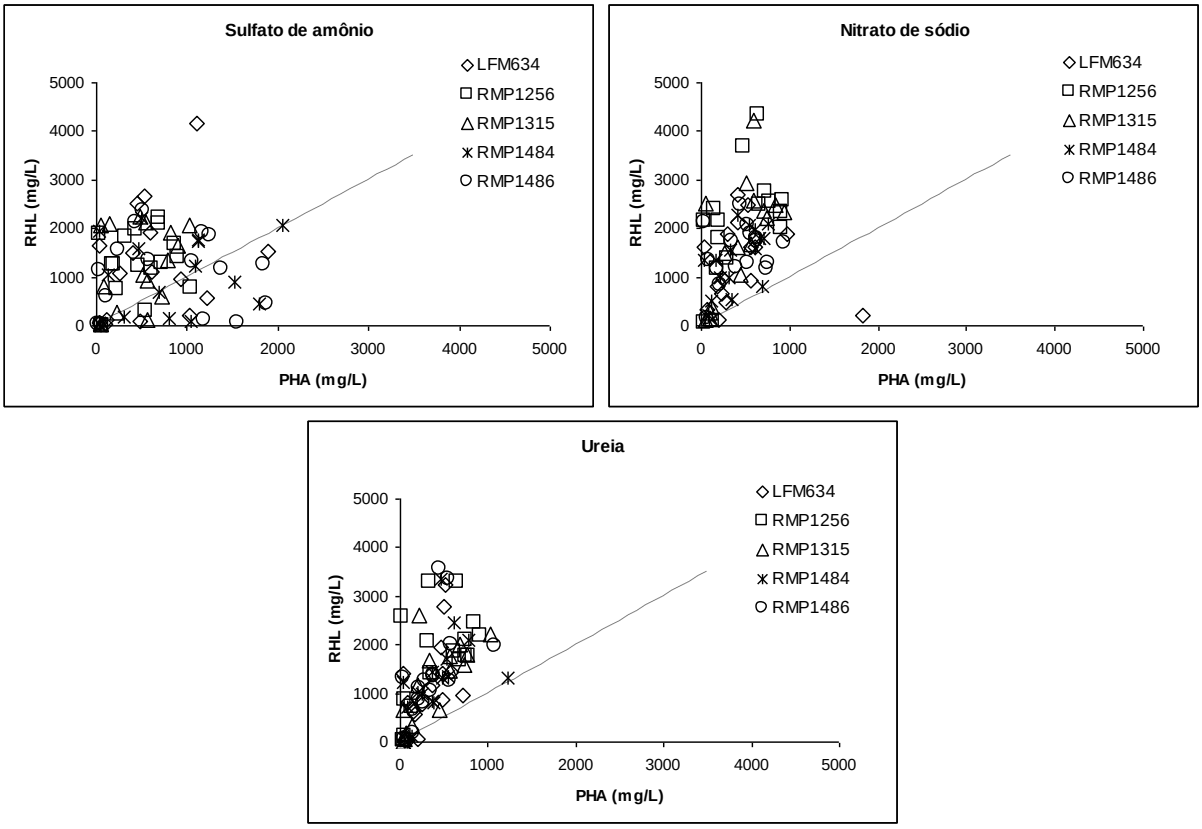
Figura 22. Correlação entre a concentração de RHLs e PHAs de acordo com as diferentes fontes de carbono.



A) substratos hidrofílicos; B) substratos hidrofóbicos.

Foi avaliada, ainda, a correlação entre a produção de RHLs e PHAs, considerando as diferentes fontes de nitrogênio (Figura 23). Utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, tanto ramnolipídios como polihidroxialcanoatos podem ser produzidos em maior quantidade, dependendo da linhagem e da fonte de carbono. Quando nitrato ou ureia foram utilizados como fontes de nitrogênio claramente observa-se uma maior produção de ramnolipídios, exceto em alguns poucos cultivos.

Figura 23. Correlação entre a concentração de RHLs e PHAs de acordo com as diferentes fontes de nitrogênio.



5.2.7 Índice de emulsificação

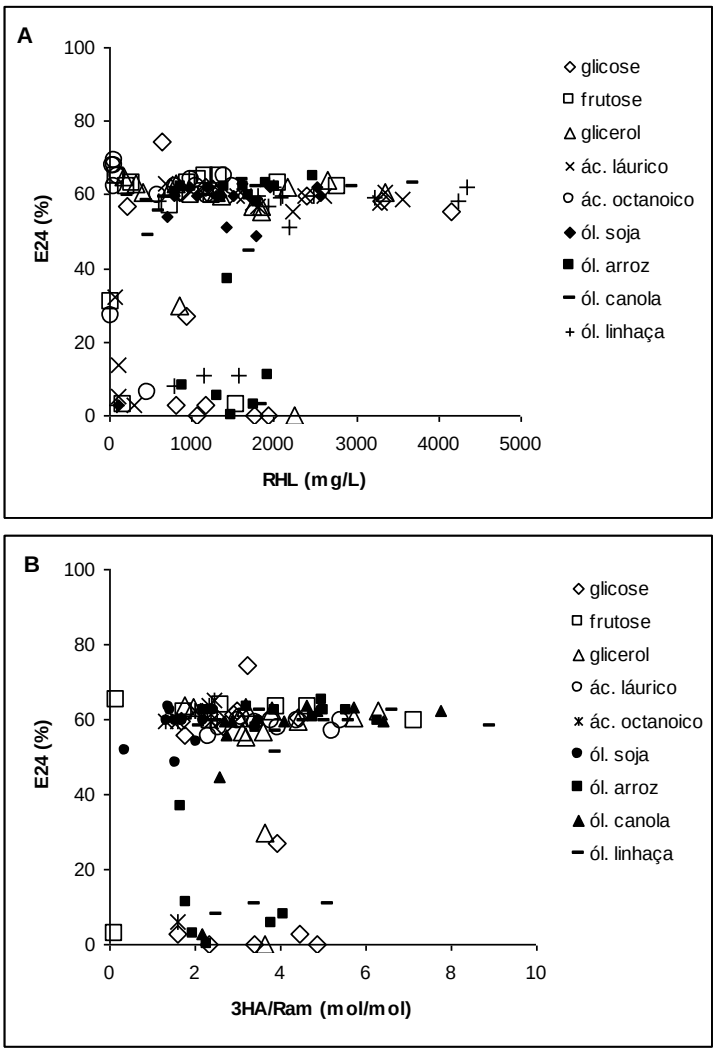
Alguns dos cultivos avaliados neste trabalho (glicose, frutose, glicerol, ácidos láurico e octanoico e óleos algodão, arroz, canola, linhaça e soja) foram avaliados também quando a propriedade emulsificante. A Figura 24 busca estabelecer relações entre a quantidade e composição dos ramnolipídios produzidos e esta propriedade tensoativa.

A quantidade de ramnolipídios não parece estar diretamente associada com o índice de emulsificação (E_{24}), uma vez que tanto valores baixos (0 a 20%) como altos (60%) de E_{24} foram observados em concentrações baixas (<1000 mg/L) e altas (>2000 mg/L) de RHLs (Figura 24A). Os resultados nos quais a concentração de RHLs foi baixa, mas o valor

detectado para E_{24} foi alto, podem ser justificados pelo baixo valor da concentração micelar crítica (CMC) dos ramnolipídios (entre 53 e 230 mg/L – COSTA et al., 2006). Com a adição crescente de surfactantes a um sistema (ar/água ou óleo/água), uma redução da tensão superficial é observada, porém até um nível crítico, acima desse nível, as moléculas anfifílicas associam-se para formar estruturas denominadas micelas. Este valor identificado no nível crítico é conhecido como CMC. Concentração micelar crítica é definido como a solubilidade proporcionada pelo surfactante em uma fase aquosa e é comumente utilizada para medir a eficiência do surfactante (DESAI e BANAT, 1997). Para a situação inversa, ou seja, altas concentrações de RHLs e baixos valores de E_{24}, poderia se imaginar valores elevados de CMC para os ramnolipídios produzidos, entretanto, outros compostos presentes no meio de cultura podem ter interferido na propriedade emulsificante, visto que as análises foram realizadas com o sobrenadante do cultivo e não com o RHL purificado.

Com relação à composição dos biossurfactantes, não se observa nenhuma correlação entre a relação 3HA/Ram dos ramnolipídios produzidos e o índice de emulsificação observado (Figura 24B). No entanto, foi possível observar a presença da propriedade emulsificante apenas quando valores de 3HA/Ram eram superiores a 1,5, indicando uma maior presença de 3HAAs, exceto em três situações, num cultivo com óleo de soja e dois cultivos utilizando frutose. Mas ainda assim, em muitas situações, altos valores de 3HA/Ram (acima de 1,5) não se observou atividade emulsificante.

Figura 24. A) Correlação entre a propriedade emulsificante e a concentração de ramnolipídios; B) Correlação entre a propriedade emulsificante e a relação 3HA/Ram.



5.3 Ensaio em biorreator

A condição de cultivo que promoveu a maior formação de RHLs (acima de 4300 mg/L) foi o cultivo realizado com o isolado RMP1256 utilizando óleo de linhaça, como fonte de carbono, e nitrato de sódio, como fonte de nitrogênio. Além disso, o óleo de linhaça apresenta em sua composição mais de 55% do ácido linoleico, o que permite uma melhor avaliação do metabolismo através da análise da composição dos produtos gerados (RHLs e PHAs), pois a β-oxidação desse ácido graxo, como já mencionado, gera um 3-hidroxiácido diferente, o 3HDdΔ_6, que não pode ser gerado pela biossíntese de ácidos graxos, permitindo assim a avaliação da contribuição das diferentes vias metabólicas para formação desses compostos. Sendo assim, essa condição foi escolhida para avaliação em ensaio de biorreator, com a finalidade de conhecer a cinética de crescimento e geração de produtos (RHLs e PHAs)

e também obter os produtos purificados para uma melhor análise da contribuição das vias metabólicas em sua biossíntese.

5.3.1 Crescimento celular e formação de PHAs e RHLs

O cultivo com o isolado RMP1256 em biorreator foi acompanhado por 72 horas (Figura 25). A biomassa seca total atingiu 9 g/L após 42 horas de cultivo e posteriormente observou uma redução, atingindo cerca de 7,5 g/L ao final do cultivo. As medidas de biomassa seca devem ser tomadas com cautela, uma vez que resíduos de ácidos graxos estão presentes. A concentração de PHAs aumentou a partir 22 horas de cultivo até 38 horas, atingindo 1,7 g/L, que corresponde a 20% da massa seca total. Até 50 horas, a concentração de PHAs manteve-se e posteriormente foi observado um declínio, atingido 0,8 g/L. Desta forma, a produção de PHAs parece estar associada ao período em que se observa crescimento celular. A concentração de RHLs também aumentou a partir de 22 horas de cultivo e atingiu o valor máximo observado após 72 horas de cultivo (aproximadamente 4,7 g/L).

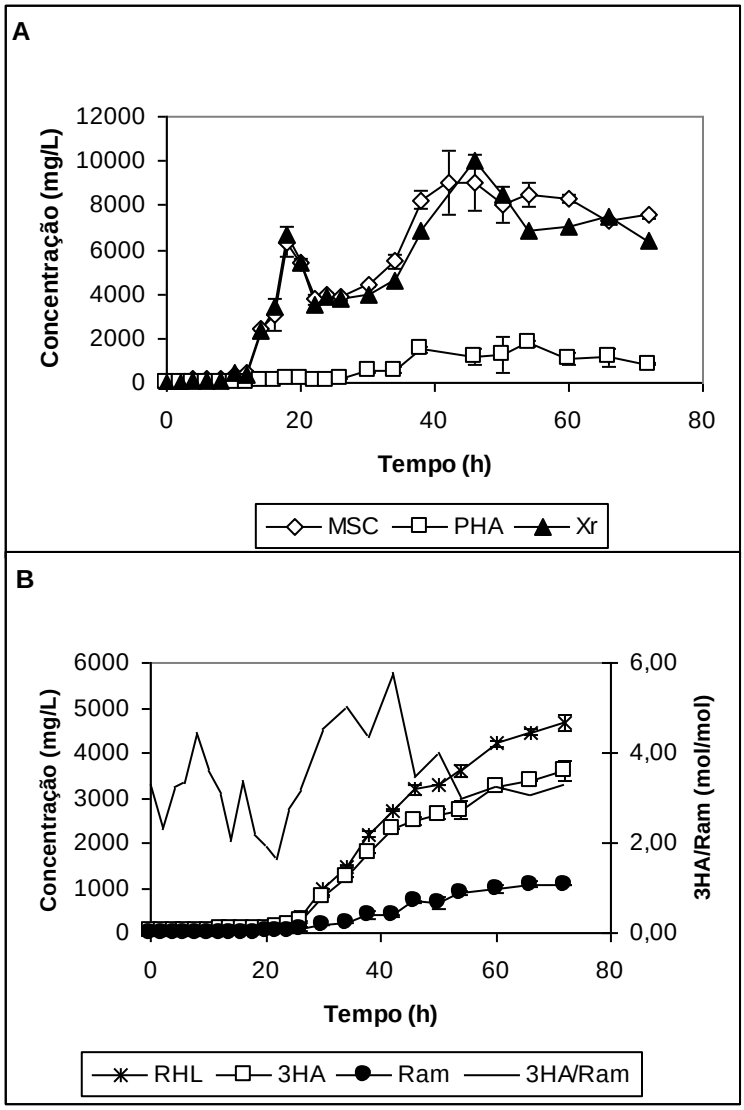
Em geral, bioprocessos em batelada alimentada representam uma efetiva estratégia para alcançar altas produtividades. Isto porque o conjunto de baixas concentrações de substratos e taxas específicas de crescimento pode ser controlado pela alimentação. Para a produção de RHLs essa estratégia tem sido efetivamente adotada, e consideráveis concentrações finais de RHLs têm sido reportadas, de 6 a 100 g/L (CHEN et al., 2007; GIANE et al., 1997; LEE et al., 2004). As principais dificuldades para melhor exploração dos cultivos em batelada alimentada são a complexa regulação genética de produção de RHLs e a excessiva formação de espumas durante os cultivos aeróbios.

Processo de batelada e batelada alimentada com *Pseudomonas aeruginosa* DSM7107 e DSM7108 alcançaram a melhor produção de RHLs já reportada. Em sua patente, GIANE et al. (1997) afirmaram a produção de mais de 100 g/L de RHLs. Infelizmente, insuficientes detalhes técnicos são fornecidos, especialmente sobre o método analítico aplicado para determinação da presença de RHLs (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2010). Cultivos em batelada alimentada com *P. aeruginosa* BYK-2 utilizando óleo de peixe como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio resultaram no maior valor de fator de conversão já reportado ($Y_{p/s}$ = 0,75 g/g), ao término do cultivo de 264h, a produção de RHLs alcançou o valor de 22,7 g/L a partir de 30,2 g/L de fonte de carbono (LEE et al., 2004).

O perfil cinético de produção de RHLs obtido nesse estudo indica que maiores quantidades poderiam ser produzidas, caso o cultivo se estendesse por um período de tempo maior (Figura 25). O tempo de cultivo pode ser um fator importante para produção de

elevadas quantidades de RHLs (COSTA et al., 2006; MÜLLER et al., 2010; SILVA et al.; 2010), sendo assim, cultivos com maiores tempos devem ser realizados para verificar se maiores concentrações de RHLs poderiam ser obtidas.

Figura 25. Cinética de crescimento e geração de produtos pelo isolado RMP1256 cultivado em óleo de linhaça como única fonte de carbono.



A) Crescimento celular e produção de PHAs; B) Produção de Ramnolipídios. MSC: massa seca celular, Xr: Massa seca residual, Ram: ramnose, 3HA: 3-hidroxiácidos.

5.3.2 Produção simultânea de RHLs e PHAs

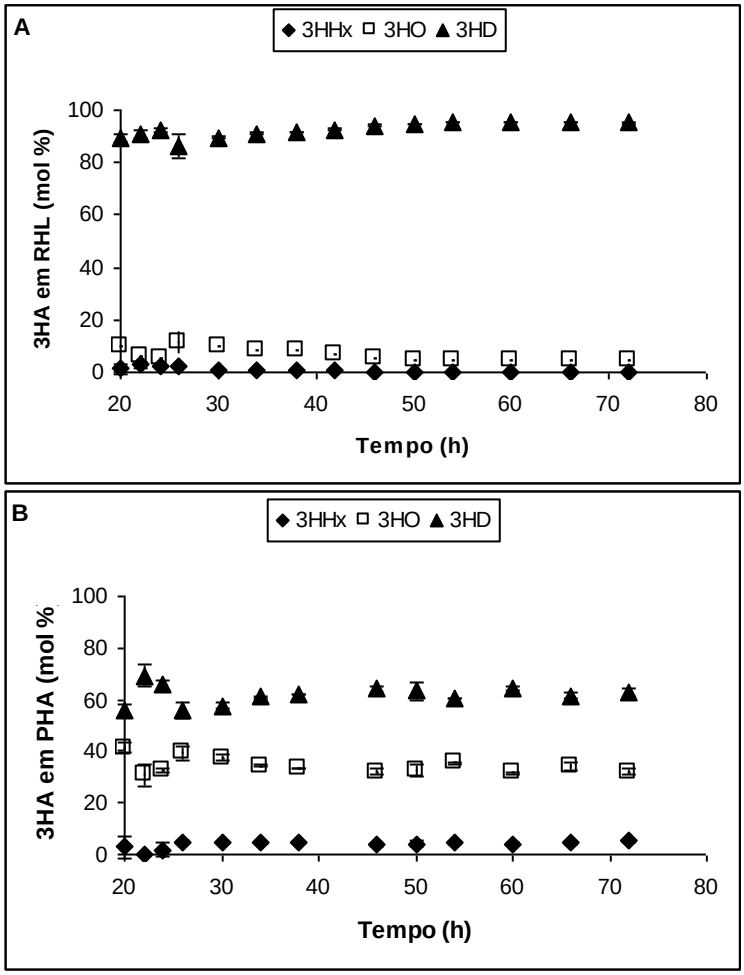
Alguns autores têm apontado que a produção simultânea de RHLs e PHAs poderia representar uma estratégia para reduzir o custo de produção destes compostos (COSTA et al., 2009b; HORI et al., 2002; MARSUDI et al., 2008). Essa estratégia pode ser eficaz, mas dependeria da produção realmente simultânea e em grandes concentrações dos dois compostos, que seriam purificados a partir de componentes diferentes do cultivo: células e

sobrenadante. Os resultados obtidos neste ensaio indicam que essa estratégia não seria eficaz, uma vez que a concentração de um dos produtos (PHAs) começou a reduzir enquanto o outro produto ainda estava sendo gerado (RHLs). Além disso, as concentrações de RHLs foram bastante superiores às de PHAs, indicando que a produção desse composto é mais eficiente e por isso estratégias futuras devem ser direcionadas para otimizar da produção de biossurfactantes.

5.3.3 Composição dos 3HAs presentes em RHLs e PHAs

Outro aspecto interessante relacionado à produção tanto de PHAs como de RHLs é que a composição destes determina suas propriedades e, portanto, possíveis aplicações. Desta forma, uma maior compreensão do metabolismo de síntese pode ser fundamental para controlar a composição de RHLs e PHAs e permitir sua síntese sob medida para diferentes aplicações. Durante o cultivo, os 3HAs presentes nos RHLs e nos PHAs foram analisados (Figura 26). Em RHLs, o 3-hidroxidecanoato (3HD) foi o principal constituinte, correspondendo a mais de 90 mol%. Esse resultado ressalta a alta especificidade da enzima RhlA em utilizar principalmente esse tipo de 3HA, como já reportado na literatura (CHOI et al., 2010; ZHU e ROCK, 2008) e observados nos ensaios em agitador rotativo. Por outro lado, em PHAs, embora 3HD seja o principal constituinte, 3-hidroxioctanoato (3HO) também é detectado em quantidades expressivas (aproximadamente 30 mol%). Os 3-hidroxidodecanoatos (3HDd) presentes tanto nos sobrenadantes (RHLs) como nas células (PHAs) não foram quantificados devido à interferência de resíduos do óleo vegetal.

Figura 26. Composição dos RHLs (A) ou PHAs (B) ao longo do cultivo em biorreator com o isolado RMP1256 utilizando óleo de linhaça.

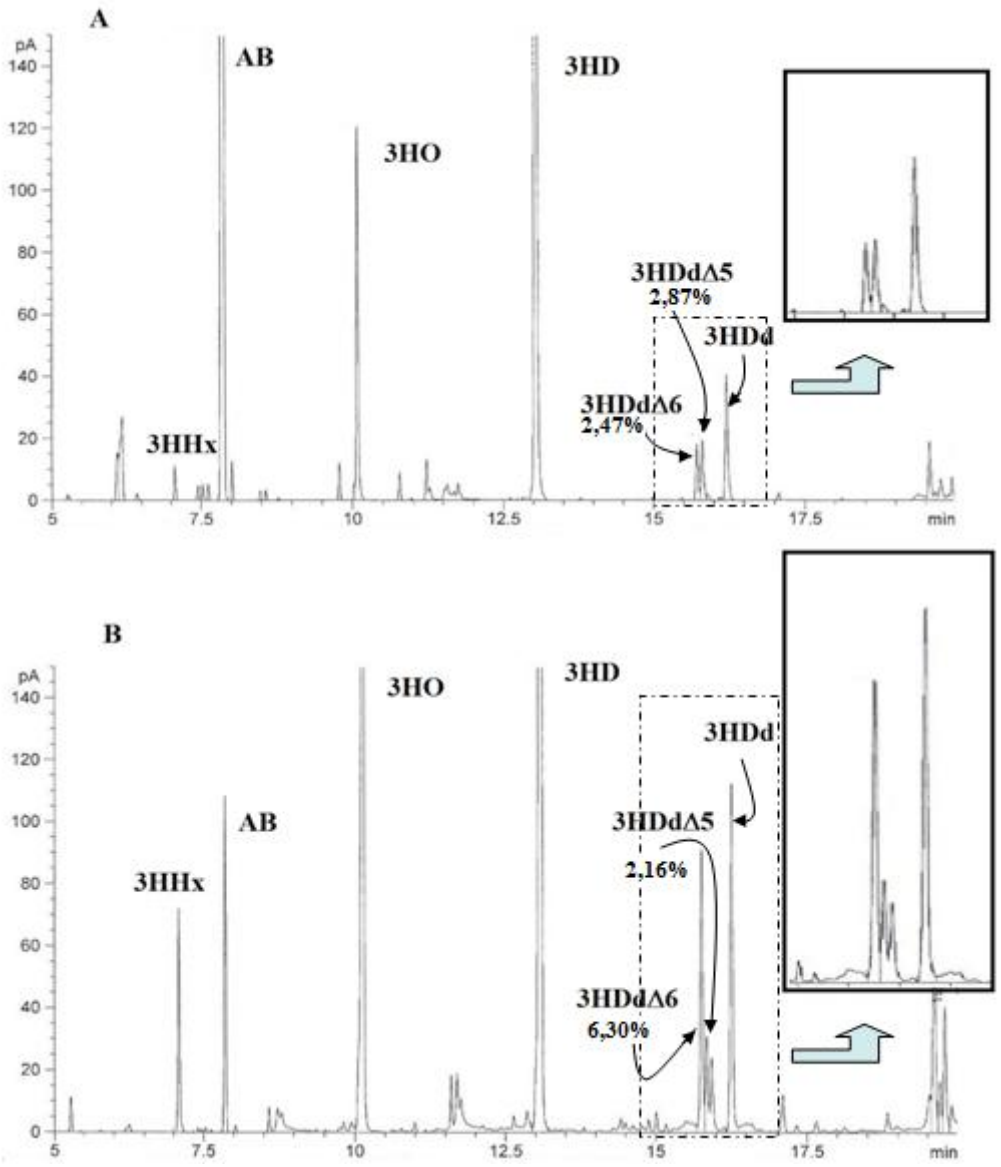


3HD, 3-hidroxidecanoato; 3HO, 3-hidroxioctanoato; 3HHx, 3-hidroxihexanoato.

A análise do PHA e do RHL purificados confirmou a presença de 3-hidroxi-6-dodecenoato (3HDdΔ_6) nesses produtos, uma vez que esse composto já havia sido identificado nas células e nos sobrenadantes dos cultivos em frascos agitados. Esse constituinte já havia sido detectado em PHAs, mas não em RHLs. A presença de 3HDdΔ_6 em RHLs como já mencionado anteriormente, indica que a β-oxidação de ácidos graxos contribui com intermediários para biossíntese desse composto, contrário ao sugerido na literatura que propõe que os 3-hidroxialcanoatos incorporados a RHLs são gerados exclusivamente a partir de intermediários da biossíntese de ácidos graxos. 3HDdΔ_5 e 3HDdΔ_6 são gerados exclusivamente a partir da biossíntese e β-oxidação de ácidos graxos, respectivamente. Considerando que os sistemas de biossíntese apresentam especificidades semelhantes por esses intermediários de 12 carbonos, a quantidade deles revelaria a contribuição de cada uma das vias de metabolismo de ácidos graxos para biossíntese de RHLs e PHAs. Conforme pode

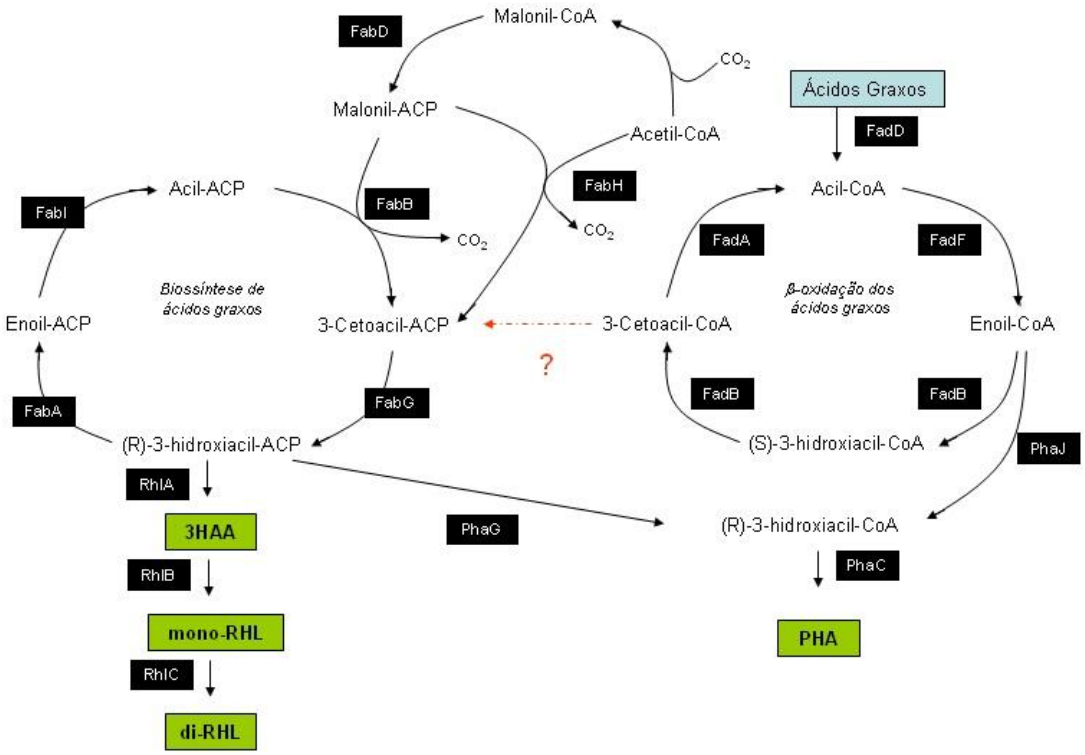
ser verificado na Figura 27, na biossíntese de PHAs a partir de óleo de linhaça, a β-oxidação de ácidos graxos contribuiria cerca de 3 vezes mais com monômeros quando comparada à biossíntese de ácidos graxos. Por outro lado, β-oxidação e biossíntese de ácidos graxos contribuiriam quase igualmente na geração de 3HAs para biossíntese de RHLs.

Figura 27. Análise por cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3HAs presentes em RHLs (A) ou PHAs (B) purificados, produzidos pelo isolado RMP1256 a partir do ensaio em biorreator com óleo de linhaça.



Esses resultados indicam que, tanto a biossíntese, quanto a β-oxidação de ácidos graxos, podem contribuir com intermediários metabólicos para a biossíntese de ramnolipídios. Para que a enzima RhlA utilize intermediários metabólicos provenientes da β-oxidação, sugere-se que uma enzima esteja atuando na conversão de 3-cetoacil-CoA para 3-cetoacil-ACP (Figura 28).

Figura 28. Proposta do metabolismo de biossíntese de RHLs considerando a contribuição da β-oxidação de ácidos graxos.



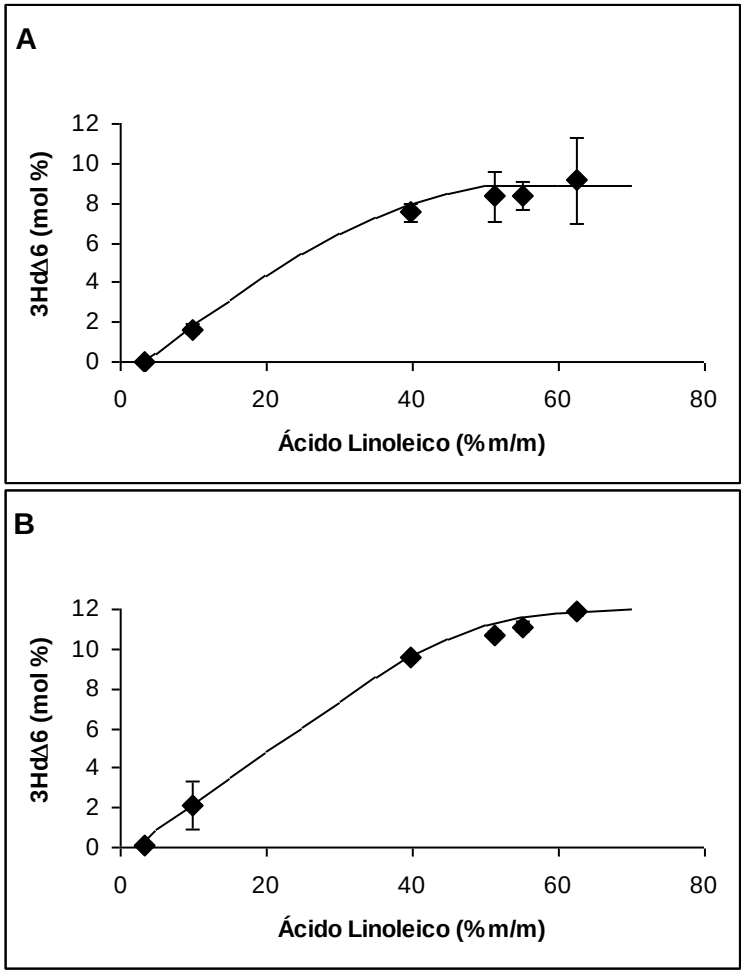
5.4 Correlação entre o 3HDdΔ_6 detectado em PHAs e RHLs e a concentração de ácido linoleico suprida

Para obter um melhor entendimento de como os ácidos graxos fornecidos podem interferir na composição de RHLs e PHAs, e desta forma avaliar a possibilidade de controlar a composição desses produtos gerados, o isolado RMP1315 foi cultivado com diferentes óleos vegetais, que diferiam na fração de ácido linoleico presente (óleos de algodão, arroz, canola, coco, girassol e palma) (Tabela 2). Ao término do cultivo, ambos os produtos gerados foram purificados e a fração molar do 3-hidroxi-6-dodecenoato foi correlacionada com a concentração de ácido linoleico suprida (Figura 29). O isolado RMP1315 foi selecionado para este experimento, pois nos cultivos utilizando óleos que continham o ácido linoleico em sua composição, o 3HDdΔ_6 sempre foi detectado em RHLs (Anexo I).

É possível visualizar o aumento da fração molar de 3HDdΔ_6 com o aumento da concentração de ácido linoleico tanto para RHLs quanto para PHAs, porém, aparentemente há uma saturação a partir de 40% m/m de ácido linoleico, pois em concentrações superiores não se observa diferenças significativas na concentração de 3HDdΔ_6. Esses resultados indicam

que a composição desses produtos pode ser controlada através da fonte de carbono fornecida, mas ainda é necessário uma melhor compreensão de como a composição dos 3HAs pode afetar as propriedades tanto de RHLs como de PHAs. SILVA-QUEIROZ et al., 2009 já haviam observado que a partir da fonte de carbono é possível controlar a composição de PHAs produzida. No entanto, para RHLs essa avaliação ainda não havia sido realizada.

Figura 29. Correlação entre a concentração de ácido linoleico suprida e a fração molar do 3HDdΔ_6 detectado em (A) RHLs e (B) PHAs.



6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter as seguintes conclusões:

- Óleo de linhaça e óleo de canola foram as fontes de carbono hidrofóbicas que promoveram a formação de maiores quantidades de ramnolipídios;
- A glicose foi a fonte de carbono hidrofílica que permitiu a produção das maiores quantidades desse biossurfactante;
- Nos cultivos utilizando óleos vegetais, nitrato de sódio se mostrou uma fonte de nitrogênio interessante para produção de grandes quantidades de ramnolipídios;
- Embora os resultados gerais indiquem algumas fontes de carbono e nitrogênio como mais interessantes para a produção de RHLs, a produção desses tensoativos é fortemente dependente da linhagem bacteriana, determinando que em cada caso deverá ser selecionada a combinação linhagem bacteriana/fonte de carbono/fonte de nitrogênio mais adequada;
- Em geral, observou-se valores altos de 3HA/Ram, sugerindo que além de mono e di-ramnolipídios uma importante parcela de 3HAAs constitui os compostos tensoativos produzidos;
- A partir de óleo de mamona um pico diferente foi detectado em altas concentrações tanto em RHLs como em PHAs, podendo corresponder ao ácido 4-hidroxidecanoato;
- Para os cultivos utilizando óleo de tungue, dois picos diferentes foram observados em PHAs, podendo corresponder ao 3-hidroxi-3,5-decenoato ($3HD\Delta_{3,5}$) e ao 3-hidroxi-3-octenoato ($3HO\Delta_{3}$);
- Nos cultivos utilizando óleos vegetais que continham em sua composição mais de 9% de ácido linoleico foi detectada a presença de 3-hidroxi-6-dodecenoato ($3HDd\Delta_{6}$) nos sobrenadantes, sugerindo que a β-oxidação de ácidos graxos deve estar contribuindo direta ou indiretamente para a biossíntese de RHLs;
- Tanto a biossíntese quanto a β-oxidação de ácidos graxos podem contribuir com intermediários metabólicos para a biossíntese de ramnolipídios. Na biossíntese de PHAs a partir de óleo de linhaça, a β-oxidação de ácidos graxos contribuiria cerca de 3 vezes mais com monômeros quando comparada à biossíntese de ácidos graxos. Por outro lado, β-oxidação e biossíntese de ácidos graxos contribuiriam igualmente na geração de 3HAs para biossíntese de RHLs. Esses resultados demonstram que é possível controlar a composição de

3-hidroxiácidos presentes nos RHLs pela oferta de óleos vegetais contendo diferentes ácidos graxos, como já havia sido demonstrado para PHAs;

- Considerando os isolados avaliados nesse estudo, tanto fontes de carbono hidrofílicas quanto hidrofóbicas parecem favorecer a formação de RHLs, ao invés de PHAs;
- Nitrato de sódio e ureia também favoreceram uma maior produção de RHLs quando comparados com a produção de PHAs;

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Aprimorar a análise da composição dos RHLs e PHAs para identificação dos diferentes compostos detectados;
- Melhorar o processo de produção de RHLs para obtenção de maiores concentrações desse produto, permitindo melhor caracterizar os efeitos de sua composição nas propriedades tensoativas.

REFERÊNCIAS*

AAGOT, N.; NYBROE. O.; NILSEN, P., JOHNSEN, K. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 5233-5239, 2001.

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

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, p. 1323-1336, 2010.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol.,** v. 54, p. 450-472. 1990, Review.

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

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

AVILA-LEÓN, I. A.; SILVA-QUEIROZ, S. R.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C. Modulação da composição de polihidroxialcanoatos produzidos por *Pseudomonas* a partir de óleos vegetais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 16., **Resumos,** Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2007.

BANAT, I. M. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced oil Recovery and oil pollution Remediation. **Bioresour. Technol.,** v. 51, p. 1-12. 1995. Review.

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

BAPTIST, J. N. Process for preparing poly-β-hydroxybutyric acid. US patent application. US 3036959. 1962.

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

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

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P.O.; BURMOLLE, M.; HENTZER, M.; HAAGENSEN, J.A.J. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. **Microbiology**, v. 151, p. 373-383, 2005

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 41, p. 77-93. 1990.

BURGER, M. M.; GLASER, L.; BURTON, R. M. The enzymatic synthesis of a rhamnosecontaining glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Biol. Chem**., v. 238, p. 2595-2601, 1963.

CHANDRASEKARAN, E. V.; BEMILLER, J. N. In: Whistler, R. L. (ed) **Methods Carbohydr. Chem.:** Academic., v. 8., , p. 89, 1980.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. K. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 72, p. 25-33, 2001.

CHEN, C. Y.; Baker, S. C.; Darton, R. C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **J. Microb. Methods**, v. 70, p. 503-510, 2007.

CHEN, S. Y.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Appl, Microbiol. Biotechnol.**, v. 76, p. 67-74, 2007.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chem. Soc.**,v. 38, p. 2434–2446, 2009. Review.

CHOI, M. H.; XU, J. GUTIERREZ, M.; YOO, T.; CHO, Y.; YOON, S. C. Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: comparative 13C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. **J. Biotech.** 2010.

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

COSTA, S. G. V. A. O; SOUZA, S. R.; NITSCHKE, M.; FRANCHETTI, S. M. M.; JAFELICCI-JR, M.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. Wettability of aqueous rhamnolipids solutions produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **J. Surfact. Deterg.,** v. 12, p. 125-130, 2009a.

COSTA, S. G. V. A. O; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 1063-1072, 2009b.

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

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J.W.The involvement of cell-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

DE KONING, G. J. M.; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 1. Solubilization. **Bioprocess Engineering,** v. 17, p. 7-13, 1997.

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

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiol. Mol. Biol.,** v. 61, p. 47-64, 1997. Review.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMERO, A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by pseudomonas aeruginosa strain 57RP grown on mannitol or naphtalene. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1440, p. 244-252, 1999.

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

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

DUBOIS, M.; GILLES, J. K.; HAMILTON, P. A.; REBERS; SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and Related Substances. **Analyt. Chim.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUSANE, D. H; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V. P.; MCLEAN, R. J. C.; WEBER, M. M.; RAHMAN, P. K. S. M. Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. **Biotechnol. Gen. Eng.**, v. 27, p. 159-184, 2010. Review.

EGGINK, G.; WAARD, P.; HUIJBERTS, G. N. M. Formation of novel poly(hydroxialkanoates) long-chain fatty acids. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES, 4., 1995, Montreal, **Abstracts**. Montreal: Canadian Journal of Microbiology, 1995. p. 14-21, Suppl. 1.

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

FUQUA, W.C.; GREENBERG, E.P. Self perception in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 183-189, 1998.

GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3000-3009, 1991.

GEORGIOU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technol.**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GIANE, C.; WULLBRANDT, D.; ROTHERT, R.; MEIWES, J. *Pseudomonas aeruginosa* and its use in process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. **United States Patent**, v. 5, p. 658-793, 1997.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* sp. de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos:** avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Pulo, São Paulo, 2000.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPELLI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon souce. **Appl. and Environ. Microbiol.,** v. 48(2), p. 302-305, 1984.

GUNTHER, N. W.; NUÑEZ, A.; FETT, W. SOLAIMAN, D. K. Y. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 71, p. 2288-2293, 2005.

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

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; KLEBER, H.P.; KLUGE, S.; SCHUSTER, G. Antiphytoviral activity of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Biotechnol.**, v. 7, p. 353-356, 1987.

HÄUSSLER, S.; NIMTZ, M.; DOMKE, T.; WRAY, V.; STEINMETZ, I. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei.* **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1588-1593, 1998.

HAUTHAL, H. G. L-Rhamnose als Zucherbaustein. **Nachr. Chem. Technol. Lab.,** v. 42, p. 285. 1994.

HENTZER, M.; TEITZEL, G. M.; BALZER, G. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S. Alginate over-production affects *Pseudomonas aerugiona* biofilm structure and function. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5395-5401, 2001.

HESTER, A. IB Market forecast. **Indust. Bioprocess.,** v. 23, p. 3, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p. 3233–3241, 1997.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T. H.; NUSSER, M.; KIRSCHHÖFER, K.; BRENNER-WEISS, G.; FRANZRED, M.; BERENSMEIER, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391(5), p. 1579-1590, 2008.

HORI, K.; MARSUDI, S.; UNNO, H. Simultaneous production of polyhydroxialcanoates and rhamnolipdids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnol. Bioeng**., v. 78 (6), p. 699-707, 2002.

ISHIGAMI, Y. Biosurfactants face increasing interest. **Inform,** v.4, p. 1156-1165, 1993.

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

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

KIM, E. J.; SABRA, W.; ZENG, A. P. Iron deficiency leads to inhibition of oxigen transfer and enhanced formation of virulence factors in culture of *Pseudomonas aerugionosa* PAO1. **Microbiology**, v. 149, p. 2627-2634, 2003.

KING, A. T.; DAVEY, M. R.; MELLOR, I. R.; MULLIGAN, B. J.; LOWE, K. C. Surfactant effects on yeast cells. **Enz. Microb. Technol.**, v. 13, p. 148-153, 1991.

KÖHLER, T.; CURTY, L.K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHERE, J.C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. Bacteriol.,** v. 182, p. 5990-5996, 2000.

KÖHLER, T.; DUMAS, J. L.; VAN DELDEN, C. Ribosome protection prevents azithromycin mediated quorum sensing modulation and satationary phase killing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemoterapy,** v. 51, p. 4243-4248, 2007.

KOSARIC, N.; GRAY, N. C. C.; CAIRNS, W. L. Biosurfactants and Biotechnology: **Surfactant Sci. Series**, Marcel Dekker. New York, v. 25, p. 1-19, 1983.

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

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

LÉPINE, F.; DEZIEL, E; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas* aeruginosa cultures. **J. Mass Spect.,** v. 37, p. 41-46, 2002.

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

MANRESA, M. A.; BASTIDA, J.; MERCADE, M. E.; ROBERT, M.; DEANDRES, C.; ESPUNY, M. J.; GUINEA, J. Kinetic-studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*-44T1. **J. Ind. Microbiol.**, v. 8, p. 133-136, 1991.

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

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J. TORRENTS, A. Effect of nutricional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. **Microbiol. Res.**, v. 155, p. 249-256, 2001

MÜLLER, M. M.; HÖRMANN, B.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, p. 167-174, 2010.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 3016-3019, 1989.

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

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an uptake on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a. Review.

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

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Struture and applications of ramnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Appl. Biochem. Biotechnol.,** v. 160, p. 2066-2074, 2010.

OCHSNER, U. A.; KOCK, A. K.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.,** v. 176, p. 2044–2054, 1994a.

OCHSNER, U. A., FIECHSTER, A.; REISER, J. Isolation, characterization and expression in Escherichia coli of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a

rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. **J. Biol. Chem.** 269: 19787–95. 1994b.

OCHSNER, U. A.; REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 92, p. 6424-6428, 1995.

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

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

OBASLI, D.; ASLIM, B. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. **J. Environ. Biol.,** v. 30, p. 161-163, 2009.

PAJARRON, A. M.; DEKOSTER, C. G.; HEERMA, W.; SCHMIDT, M,; HAVERKAMP, J. Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast-atom-bombardment tandem mass-spectrometry. **Glycoconj. J.**, v. 10, p. 219–226, 1993.

PASSADOR, L.; COOK, J. M.; GAMBELLO, M. J.; RUST, L.; IGLEWSKI, B. H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, v.260, p. 1127-1130, 1993.

PEIXOTO, R. M. **Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes.** 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PELCZAR, Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiology:** concepts and applications. New York: McGraw Hill. p. 896, 1993.

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

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

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. **Mol. Microbiol.,** v. 40, p. 708–718, 2001.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATILLE P.; RAMSAY, J. A. Production of poly-β-hydroxybutyric-β-hydroxyvaleric acids. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 56, p. 2093–2098, 1990.

RAZA, Z. A.; KHALID, Z. M.; BANAT, I. M. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. **J. Environ. Scien. Health Part A,** v. 44, p. 1367-1373, 2009.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature,** v. 8, p. 578- 592, 2010. Review.

REIS, R. S.; PEREIRA, A. G.; NEVES, B. C.; FREIRE, D. M. G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresour. Tchnol.**, v. 102, p. 6377-6384, 2011. Review.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass-esther hydrochloric acid propanolisis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

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

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

SABRA, W.; KIM, E. J.; ZENG, A. P. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. **Microbiology,** v. 148, p. 3195-3202, 2002.

SANCHEZ, R. J.; SCHRIPSEMA, J.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. Médium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. **Eur. Polym. J.**, v. 39, p. 1385-1394, 2003.

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. P. W.; VASQUEZ, G. S.; SANTA ANNA, L. M.; JR, N. P.; FREIRE, D. M. G. Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Rhamnolipids by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Biochem. Biotechnol**., v. 98, p.1025-1034, 2002.

SIEGMUNG, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnol. Tech.,** v. 5(4), p. 265–268, 1991.

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

SILVA-QUEIROZ, S.R.; SILVA, L.F.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C. PHAMCL biosynthesis systems in *Pseudomonas* aeruginosa and *Pseudomonas* putida strains show differences on monomer specificities. **J. Bacteriol.**, v.143, p.111-118, 2009.

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

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; **Biosurfactants: from genes to applications**. Microbiology Monographs, Berlim: Springer, 2010. 216 p.

STANGHELINI, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. **Plant Disease**, v. 81, p. 4-12, 1997.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D. (ed). **Biomaterials novel materials from biological sources.** New York: Macmillan Publishers Basingstoke., 1991, p. 123-213.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity for bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 28, p. 128-219, 1995.

STRELEC, T. **Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídios e polihidroxialcanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese.** 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2006.

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* DMS 2874. **Z. Naturforsch.,** v. 40c, p.61-67, 1985.

TODER, D. S.; GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase gene under transcriptional control of LasR. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 2003-2010, 1991.

TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CHRISTINE L. C. **Microbiologia**. 8ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2005, 312 p.

VAN ALST, N. E.; PICARDO, K. F.; IGLEWSKI, B. H.; HAIDARIS, C.G. Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 75 (8), 3780-3790, 2007.

VENKATA RAMANA, K.; KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aerugionosa* CFTR-6 under submerged conditions. **J. Chem. Tech. Biotechbol.**, v. 45, p. 249-257, 1989.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petro-chemical wastewater. **Biochem. Eng. J.**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W. C.; CAMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacteria world. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.,** v. 362, p. 1119-1134, 2007.

WINZER, K.; FALCONER, C.; GARBER, N. C.; DIGGLE, S. P.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL e PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6401-6411, 2000.

WITHOLT, B.; KESSLER, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxialkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.10(3), p. 279-285, 1999.

WUBBOLTS, M. G.; WITHOLT, B. Selected industrial biotransformations. ATKINSON. T.; SHERWOOD. R. F. (Eds) **Biotech. Handbooks 10 – *Pseudomonas.*** New York:: Plenum Press. 1998. p. 271-329.

ZHU, K.; ROCK, C. O. RhlA Converts β-Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Intermediates in Fatty Acid Synthesis to the β-Hydroxydecanoyl-β-Hydroxydecanoate Component of Rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.,** v. 190(9), p. 3147–3154, 2008.

Anexo A

Apresentação dos resultados completos obtidos nos experimentos quantitativos de produção de ramnolipídios.

Anexo A – I) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de glicose (cerca de 20 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios										
							Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		3,43	2,32	1,11	6,86	5,38	3,43	0,32	19,83	65,12	5,63	7,14	32,44	1112,69	-	0,72	6,59	82,41	4,16	6,12	2689,72	1464,91	4153,91	1,75	55,60
	A	±0,06					±0,06	±0,45	±0,24	±0,04	±0,38	±0,30	±3,77			±0,02	±0,04	±0,01	±0,02	±0,03	±47,89		±48,08		
		3,90	2,07	1,83	7,17	4,97	-	0,67	8,47	77,28	5,99	7,59	47,01	1833,39	2,70	3,06	13,62	66,49	8,00	6,14	219,78	-	219,78	-	56,80
LFM634	N	±0,04						± 0,19	±1,85	±2,22	±0,18	±0,01	±4,41		±0,20	±0,02	±0,78	±2,88	±0,06	±1,83	±6,70		±6,70		
		4,45	4,30	0,15	7,19	8,59	-	-	1,53	50,78	7,74	39,96	3,31	147,30	-	-	1,95	79,78	6,04	12,13	495,76	143,93	639,43	3,22	74,40
	U	±0,07							±2,16	±0,75	±2,18	±3,60	±0,08				±0,55	±0,52	±0,06	±0,08	±34,27		±34,65		
		0,87	0,69	0,18	6,86	6,25	-	0,41	8,90	71,29	8,90	10,52	20,38	177,31	-	1,81	4,96	82,58	5,31	5,35	939,79	307,80	1246,30	2,92	61,50
	A	±0,01						±0,57	±0,70	±3,57	±2,03	±1,68	±3,12			±0,43	±0,01	±3,45	±0,32	±3,37	±26,26		±24,75		
		0,52	0,38	0,14	7,17	5,91	-	-	10,81	73,41	7,37	8,42	27,81	144,61	-	0,12	5,13	81,75	5,17	7,84	1571,86	864,98	2390,98	1,68	59,50
RMP 1256	N	±0,01							±0,41	±0,30	±0,17	±0,27	±6,44			±0,16	±0,01	±0,13	±0,28	±0,01	±103,31		±38,18		
		3,67	3,35	0,32	7,19	6,68	-	2,01	17,01	59,97	6,74	14,27	8,80	322,96	-	0,18	6,20	82,13	5,27	6,22	2434,52	874,96	3307,96	2,65	58,30
	U	±0,11						±0,01	±0,35	±0,66	±0,03	±0,95	±1,21			±0,00	±0,00	±0,20	±0,23	±0,01	±23,37		±25,45		
		2,24	1,68	0,56	6,86	5,52	1,22	1,27	11,18	71,48	6,27	8,59	25,19	564,26	-	6,03	5,98	76,29	4,83	6,88	746,55	183,83	930,33	3,94	27,00
	A	±0,04					±0,05	±0,04	±0,21	±0,62	±0,55	±0,06	±2,87			±0,01	±0,06	±0,74	±0,33	±0,33	±33,86		±33,23		
		2,21	1,76	0,45	7,17	4,98	1,39	1,06	10,55	71,17	6,95	8,89	20,31	448,85	1,13	2,19	4,69	76,15	7,69	8,18	743,86	304,95	1049,45	2,33	0,00
RMP1315	N	±0,09					±0,01	±0,06	±0,07	±0,09	±0,08	±0,11	±2,34		±0,46	±0,33	±0,18	±0,81	±0,83	±0,28	±41,26		±41,72		
		4,52	4,32	0,20	7,19	8,60	1,33	1,51	2,19	60,14	7,28	27,56	4,45	201,14	-	0,36	2,00	79,72	6,68	11,26	895,16	280,73	1175,73	2,99	62,20
	U	±0,07					±1,41	±0,01	±0,25	±4,29	±2,62	±0,52	±0,37			±0,08	±0,02	±0,04	±0,06	±0,03	±39,83		±39,60		
		2,90	1,78	1,12	6,86	4,92	-	0,68	8,99	77,58	5,41	7,36	38,52	1117,08	0,56	0,78	6,04	79,61	5,17	7,85	1379,84	389,03	1768,53	3,38	0,00
	A	±0,13						±0,00	±0,01	±0,01	±0,03	±0,01	±1,07		±0,07	±0,22	±0,03	±0,66	±0,32	±0,09	±64,62		±65,76		
		2,23	1,54	0,69	7,17	5,07	0,12	0,61	7,05	76,51	6,86	8,87	30,94	689,96	1,14	2,49	4,57	73,68	8,46	9,67	667,07	142,50	810,00	4,46	2,70
RMP1484	N	±0,25					±0,16	±0,04	±0,22	±0,12	±0,23	±0,06	±2,70		±0,17	±0,42	±0,21	±1,29	±0,64	±0,26	±33,13		±33,23		
		5,33	4,97	0,36	7,19	8,37	-	0,81	0,82	74,56	4,83	18,99	6,71	357,64	-	0,65	1,63	78,69	6,12	12,93	609,55	230,38	840,88	2,48	60,50
	U	±0,30						±0,46	±0,61	±11,05	±2,84	±8,06	±2,81			±0,15	±0,04	±0,61	±0,40	±0,31	±43,72		±43,13		
		2,99	1,82	1,17	6,86	4,94	-	0,61	8,75	77,68	5,46	7,51	39,07	1168,19	0,33	0,49	5,72	81,34	4,73	7,41	1609,22	314,69	1923,69	4,87	0,00
	A	±0,10						±0,13	±0,33	±0,64	±0,14	±0,04	±3,27		±0,16	±0,29	±0,08	±0,86	±0,00	±0,32	±231,00		±230,52		
		2,30	1,56	0,74	7,17	5,05	0,31	0,67	7,60	75,59	7,06	8,81	32,11	738,53	1,00	3,33	4,52	75,13	6,79	9,24	723,02	437,48	1159,98	1,58	2,70
RMP1486	N	±0,01					±0,44	±0,01	±0,57	±0,26	±0,25	±0,11	±4,59		±0,60	±1,32	±0,38	±1,51	±0,78	±1,06	±60,17		±58,69		
		5,37	5,15	0,22	7,19	8,34	-	-	1,07	62,66	6,99	29,29	4,05	217,49	-	0,24	1,73	79,33	6,53	12,17	722,06	152,48	873,98	4,42	60,50
	U	±0,00							±0,07	±2,24	±1,10	±3,43	±0,25			±0,33	±0,01	±0,14	±0,21	±0,25	±11,53		±12,02		

MSC – Massa seca celular · 3HB - 3-hidroxibutirato · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,85 - N=7,11 - U=7,69 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – II) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de frutose (cerca de 20 g/L).

							Polihidroxialcanoatos							Ramnolipídios									
		MSC	X_R	X_{PHA}	pH		Composição PHA (mol%)					PHA	PHA	Composição RHL (mol%)					Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	(g/L)	(g/L)	(g/L)	In.	Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		2,61	2,35	0,26	7,18	6,21	1,90	17,68	67,18	4,00	9,25	10,00	261,00	1,07	5,55	83,51	3,04	6,83	789,18	289,28	1078,28	2,61	63,90
	A	±0,13					±0,30	±3,05	±6,12	±0,64	±2,12	±2,60		±0,27	±0,07	±0,17	±0,18	±0,18	±18,58		±18,38		
		2,05	1,81	0,24	7,21	7,75	1,61	15,14	72,35	3,61	7,31	11,78	241,49	6,39	5,69	79,67	3,45	4,81	757,37	188,10	945,10	3,93	63,20
LFM634	N	±0,13					±0,23	±2,30	±4,19	±0,53	±1,16	±2,14		±0,37	±0,13	±1,48	±0,03	±1,96	±10,90		±11,31		
		4,29	3,79	0,50	7,24	7,10	1,03	17,85	65,36	4,99	10,79	11,60	497,64	0,73	6,63	83,24	3,91	5,51	1798,27	980,41	2778,91	1,76	61,90
	U	±0,21					±1,45	±0,26	±0,86	±0,21	±1,07	±0,39		±0,14	±0,05	±0,56	±0,20	±0,16	±69,28		±70,00		
		1,66	1,43	0,23	7,18	6,27	2,27	16,94	65,87	4,59	10,35	13,83	229,58	1,02	6,26	84,32	3,12	5,29	743,53	-	743,53	-	56,80
	A	±0,01					±0,21	±1,08	±0,64	±0,65	±1,27	±1,38		±1,43	±0,70	±0,34	±0,27	±0,13	±134,77		±134,77		
		1,85	1,66	0,19	7,21	7,74	2,57	18,43	68,31	-	10,71	10,17	188,15	0,37	5,93	83,09	4,14	6,48	1166,96	-	1166,96	-	64,90
RMP 1256	N	±0,1					±0,02	±0,12	±0,30		±0,19	±0,33		±0,13	±0,57	±0,73	±0,37	±0,79	±146,19		±146,19		
		3,64	3,32	0,32	7,24	7,08	1,79	15,32	63,35	5,45	14,11	8,68	315,95	0,27	5,93	83,28	4,15	6,41	1714,54	350,55	2062,05	4,65	63,20
	U	±0,01					±2,52	±0,10	±3,27	±0,09	±0,74	±0,10		±0,01	±0,54	±0,41	±0,11	±0,29	±23,76		±24,75		
		1,28	1,23	0,05	7,18	6,63	-	-	71,50	-	28,50	3,65	46,72	22,73	-	42,37	-	34,90	57,07	-	29,00	-	30,60
	A	±0,01							±4,37		±4,37	±0,28		-	-	-	-	-	-		±41,01		
		2,33	2,24	0,09	7,21	7,64	-	4,86	80,08	-	15,06	4,03	93,90	15,50	2,59	72,85	4,00	5,07	276,34	-	276,00	-	63,20
RMP1315	N	±0,01						±0,99	±4,04		±3,05	±0,62		±8,70	±0,32	±8,53	±0,40	±0,56	±22,54		±22,63		
		1,29	1,25	0,04	7,24	8,29	-	-	67,27	-	32,74	3,13	40,38	52,94	-	30,14	-	16,93	80,87	-	81,00	-	64,90
	U	±0,06							±8,49		±8,49	±0,53		±8,57		±4,58		±3,98	±14,53		±15,56		
		2,79	2,49	0,30	7,18	6,33	-	5,53	79,29	4,32	10,87	10,90	304,11	16,00	5,92	61,03	1,05	16,02	169,18	-	169,00	-	2,70
	A	±0,08						±0,79	±2,23	±0,45	±0,98	±0,08		±6,76	±0,60	±1,64	±1,48	±3,05	±1,61		±1,41		
		1,93	1,85	0,08	7,21	7,94	-	6,74	79,63	-	13,63	4,03	77,78	20,92	3,02	60,14	2,89	13,05	219,92	-	220,50	-	62,20
RMP1484	N	±0,13						±1,17	±3,11		±1,93	±0,63		±1,86	±0,20	±0,03	±0,22	±1,47	±0,30		±0,71		
		4,47	4,23	0,24	7,24	7,20	-	8,76	74,02	3,85	13,37	5,47	244,51	3,87	5,20	81,65	3,76	5,33	708,38	290,70	998,70	2,35	59,50
	U	±0,04						±2,09	±5,81	±0,81	±2,90	±0,84		±0,63	±0,00	±0,59	±0,62	±1,56	±7,83		±7,07		
		2,72	2,48	0,24	7,18	6,34	-	5,35	79,92	4,03	10,71	8,94	243,17	26,00	5,47	54,90	-	13,64	159,97	1382,26	1542,26	0,12	2,70
	A	±0,28						±0,11	±0,16	±0,04	±0,23	±0,18		±0,12	±0,04	±2,60		±2,44	±13,79		±14,14		
		2,21	2,12	0,09	7,21	7,92	-	6,36	77,12	2,38	14,15	3,98	87,96	23,11	2,82	59,29	2,42	12,38	193,00	1141,43	1334,93	0,17	64,90
RMP1486	N	±0,28						±0,63	±8,27	±3,37	±4,28	±0,00		±1,63	±0,08	±0,93	±0,64	±1,82	±4,60		±4,95		
		5,76	5,48	0,28	7,24	7,13	-	11,02	72,97	-	16,01	4,93	283,97	1,04	5,23	83,69	3,99	6,06	1107,68	148,44	1255,44	7,12	59,50
	U	±0,23						±0,88	±1,06		±0,18	±0,31		±0,67	±0,18	±0,83	±0,15	±0,20	±8,28		±7,07		

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,97 - N=7,12 - U=7,51 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – III) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de glicerol (cerca de 20 g/L).

							Polihidroxialcanoatos							Ramnolipídios										
		MSC	X_R	X_{PHA}	pH		Composição PHA (mol%)					PHA	PHA	Composição RHL (mol%)					Concentração (mg/L)				3HA/Ram	E24
Isolados	FN	(g/L)	(g/L)	(g/L)	In.	Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		2,96	2,43	0,53	7,32	6,34	2,35	25,06	64,42	2,65	5,53	17,82	527,47	-	0,52	7,96	83,02	3,61	4,90	1721,59	936,23	2657,73	1,77	63,90
	A	±0,61					±0,28	±0,27	±0,08	±0,01	±0,08	±1,73			±0,06	±0,31	±0,08	±0,13	±0,18	±84,76		±84,15		
		1,46	1,39	0,07	7,32	7,49	0,76	8,96	61,76	9,65	19,16	4,50	65,70	-	0,90	4,19	87,03	-	7,89	319,06	-	319,06	-	63,20
LFM634	N	±0,54					±1,07	±1,61	±9,35	±2,44	±4,24	±0,13			±0,21	±0,33	±0,70		±0,17	±5,24		±5,24		
		1,37	1,28	0,09	7,34	8,38	-	3,85	78,71	5,71	11,75	6,42	87,95	-	-	3,81	83,16	5,36	7,69	538,71	262,20	800,70	1,94	63,20
	U	±0,06						±0,09	±1,36	±0,23	±1,04	±0,91				±0,05	±0,02	±0,01	±0,02	±11,92		±10,62		
		2,25	1,93	0,32	7,32	6,26	2,66	25,73	64,62	1,10	5,88	14,08	316,86	-	0,35	8,22	83,80	2,79	4,86	1446,83	389,03	1835,03	3,57	56,80
	A	±0,28					±0,02	±1,76	±1,35	±1,55	±1,58	±3,28			±0,01	±0,11	±0,23	±0,13	±0,01	±2,47		±2,83		
		1,52	1,33	0,19	7,32	7,72	2,93	29,69	63,84	-	3,54	12,69	192,88	-	0,44	9,00	82,65	3,00	4,92	1867,34	286,43	2153,93	6,28	62,20
RMP 1256	N	±0,16					±0,03	±0,05	±0,06		±0,09	±0,00			±0,00	±0,00	±0,06	±0,08	±0,01	±19,52		±19,09		
		3,43	3,37	0,06	7,34	5,72	-	-	68,51	-	31,49	1,65	56,50	-	-	1,25	84,22	4,91	9,64	682,14	175,28	856,78	3,65	29,70
	U	±0,13							±0,25		±0,25	±0,05				±0,04	±0,11	±0,16	±0,01	±19,72		±19,09		
		2,84	2,36	0,48	7,32	6,11	2,08	18,77	70,88	2,44	5,84	17,02	483,37	0,46	0,34	8,10	83,46	3,26	4,39	1769,00	471,68	2240,68	3,61	ND
	A	±0,23					±0,13	±1,32	±2,00	±0,16	±0,40	±1,95		±0,28	±0,01	±0,08	±0,41	±0,07	±0,11	±70,66		±70,71		
		2,48	2,37	0,11	7,32	7,50	-	2,79	79,49	5,22	12,51	4,60	114,08	-	-	2,96	82,09	5,02	9,95	397,73	-	397,73	-	60,50
RMP1315	N	±0,26						±1,36	±9,60	±2,73	±5,51	±1,75				±0,59	±1,68	±0,15	±0,95	±70,21		±70,21		
		1,60	1,53	0,07	7,34	8,30	-	-	80,13	40,70	15,17	4,47	71,52	-	-	2,36	77,47	5,35	14,83	169,30	-	169,30	-	64,90
	U	±0,04							±2,57	±0,62	±1,95	±0,71				±0,14	±0,42	±0,17	±0,09	±0,66		±0,66		
		3,86	2,74	1,12	7,32	6,26	1,06	14,65	76,77	2,71	4,83	28,89	1115,15	-	0,68	10,78	81,67	2,90	3,99	1326,74	416,10	1742,60	3,08	56,80
	A	±0,01					±0,00	±0,35	±0,69	±0,11	±0,23	±0,82			±0,05	±0,21	±0,37	±0,04	±0,08	±125,60		±125,16		
		1,20	1,03	0,17	7,32	7,73	1,76	18,88	69,44	3,58	6,35	14,27	171,24	-	0,42	7,13	82,63	4,11	5,72	1116,81	242,25	1359,25	4,41	59,50
RMP1484	N	±0,75					±0,10	±0,70	±1,26	±0,16	±0,30	±1,39			±0,00	±0,01	±0,11	±0,11	±0,00	±38,66		±38,18		
		1,37	1,28	0,09	7,34	8,25	-	3,49	74,34	6,66	15,52	6,38	87,41	-	-	4,20	84,79	4,51	6,51	585,72	146,78	732,28	3,79	62,20
	U	±0,84						±2,01	±15,45	±4,21	±9,23	±3,42				±0,04	±0,14	±0,25	±0,06	±48,76		±48,79		
		4,40	3,15	1,25	7,32	6,25	1,08	14,85	76,13	2,92	5,02	28,30	1245,20	-	0,74	10,76	81,51	2,96	4,04	1413,16	428,93	1841,43	3,19	55,30
	A	±0,44					±0,03	±0,16	±0,40	±0,06	±0,14	±1,41			±0,03	±0,24	±0,02	±0,13	±0,11	±111,36		±111,02		
		4,43	3,68	0,75	7,32	7,79	1,61	17,98	71,47	3,27	5,69	16,92	749,56	-	0,39	6,86	82,66	4,18	5,92	1107,30	185,25	1291,75	5,71	60,50
RMP1486	N	±1,79					±0,37	±3,98	±5,56	±0,35	±0,88	±0,12			±0,06	±0,08	±0,06	±0,07	±0,13	±41,86		±41,72		
		4,04	3,49	0,55	7,34	7,14	1,87	18,99	68,45	2,91	7,79	13,66	551,86	-	0,42	8,70	82,27	3,64	4,98	2545,62	805,13	3350,63	3,04	60,50
	U	±0,95					±0,20	±1,05	±1,53	±0,04	±0,32	±0,91			±0,01	±0,04	±0,12	±0,09	±0,08	±104,26		±103,94		

MSC – Massa seca celular · 3HB - 3-hidroxibutirato · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · ND – Não determinado · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,98 - N=7,20 - U=7,63 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – IV) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de ácido láurico (cerca de 5 g/L).

							Polihidroxialcanoatos							Ramnolipídios									
					pH		Composição PHA (mol%)					PHA	PHA	Composição RHL (mol%)					Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	In.	Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		2,08	1,59	0,49	7,16	4,79	1,61	17,40	62,64	3,07	15,29	23,47	488,18	6,81	33,88	55,34	-	3,97	104,05	-	104,05	-	13,90
	A	±0,04					±0,40	±1,52	±1,90	±0,24	±0,23	±0,03		±0,06	±0,95	±0,96		±0,06	±1,98		±1,98		
		1,44	1,21	0,23	7,16	7,02	2,46	25,08	55,63	2,08	14,75	16,07	231,41	3,05	27,44	56,03	1,64	11,85	670,49	-	670,49	-	63,20
LFM634	N	±0,15					±0,07	±0,82	±0,20	±0,35	±0,20	±0,95		±0,16	±0,19	±0,14	±0,01	±0,18	±6,42		±6,42		
		3,48	3,28	0,20	7,21	5,01	-	13,16	55,06	3,97	27,82	5,88	204,62	-	3,73	74,17	-	22,11	66,12	-	66,12	-	32,40
	U	±0,06						±1,17	±0,86	±0,25	±0,56	±0,11			±0,16	±0,27		±0,11	±2,47		±2,47		
		2,05	1,51	0,54	7,16	4,57	2,37	23,36	59,68	1,85	12,76	26,56	544,48	10,18	21,55	58,59	2,45	7,24	298,90	-	298,90	-	2,70
	A	±0,01					±0,28	±2,14	±2,96	±0,15	±0,69	±0,22		±0,34	±1,04	±3,59	±0,07	±2,28	±36,20		±36,20		
		1,25	1,06	0,19	7,16	6,67	5,17	34,23	47,47	-	13,14	15,19	189,88	3,11	19,11	70,70	2,74	4,35	1513,15	286,43	1799,57	5,22	56,80
RMP1256	N	±0,04					±1,25	±7,93	±6,76		±0,08	±4,85		±0,06	±0,24	±0,04	±0,04	±0,30	±144,62		±144,63		
		3,96	3,32	0,64	7,21	6,98	5,37	35,50	46,52	-	12,62	16,16	639,94	0,36	8,87	81,67	3,47	5,63	2637,49	641,25	3278,74	3,95	57,90
	U	±0,27					±1,00	±6,87	±6,53		±0,66	±0,56		±0,01	±0,38	±0,66	±0,13	±0,16	±113,12		±113,11		
		2,06	1,49	0,57	7,16	5,47	2,26	25,27	60,26	2,01	10,21	27,57	567,94	10,22	11,58	74,54	-	3,79	108,53	-	108,53	-	5,41
	A	±0,06					±0,58	±7,62	±9,04	±0,25	±1,10	±3,77		±0,45	±3,85	±3,16		±0,40	±3,03		±3,03		
		1,65	1,24	0,41	7,16	7,81	4,13	40,70	41,77	1,10	12,29	25,01	412,67	0,53	6,93	82,14	4,26	6,16	1238,23	393,30	1631,53	3,01	59,50
RMP1315	N	±0,04					±0,04	±0,20	±0,20	±0,01	±0,03	±2,16		±0,02	±0,07	±0,04	±0,04	±0,04	±12,66		±12,67		
		3,12	2,90	0,22	7,21	7,20	2,33	19,34	56,77	3,78	17,80	7,15	223,08	0,42	7,95	80,95	3,97	7,02	2086,10	522,98	2609,08	3,81	59,50
	U	±0,13					±0,25	±1,69	±1,52	±0,13	±0,30	±1,29		±0,02	±0,00	±0,09	±0,06	±0,03	±145,71		±145,71		
		2,02	1,52	0,50	7,16	6,24	2,70	29,97	54,05	1,74	11,55	24,86	502,17	0,38	6,36	83,98	3,45	5,84	1580,32	646,95	2227,27	2,34	55,30
	A	±0,01					±0,01	±0,72	±0,47	±0,21	±0,02	±0,06		±0,00	±0,20	±0,33	±0,06	±0,08	±681,15		±681,15		
		1,47	1,13	0,34	7,16	6,93	3,83	39,75	43,76	1,17	11,50	22,93	337,07	2,41	6,80	82,22	3,18	5,41	1319,00	235,13	1554,12	5,41	59,50
RMP1484	N	±0,01					±0,11	±1,39	±1,80	±0,08	±0,39	±0,67		±0,04	±0,05	±0,03	±0,15	±0,01	±43,17		±43,16		
		3,84	3,38	0,46	7,21	7,15	2,99	32,96	52,07	1,69	10,30	11,97	459,65	0,43	9,17	81,53	3,39	5,51	2549,44	792,30	3341,74	3,09	60,50
	U	±0,01					±0,02	±0,47	±0,42	±0,03	±0,04	±0,60		±0,02	±0,08	±0,40	±0,22	±0,28	±14,45		±14,45		
		2,08	1,57	0,51	7,16	6,29	2,91	32,29	50,93	1,73	12,14	24,32	505,86	0,42	6,54	83,44	3,60	6,00	1941,45	421,80	2363,25	4,40	59,50
	A	±0,12					±0,03	±0,00	±0,13	±0,13	±0,04	±0,91		±0,01	±0,06	±0,27	±0,11	±0,11	±115,94		±115,94		
		1,52	1,18	0,34	7,16	6,94	3,89	41,14	42,13	1,06	11,79	22,47	341,54	4,68	11,12	76,25	3,03	4,96	1261,52	477,38	1738,89	2,59	57,90
RMP1486	N	±0,08					±0,08	±3,17	±4,06	±0,04	±0,86	±0,45		±0,05	±0,10	±0,08	±0,04	±0,02	±25,48		±25,48		
		3,90	3,45	0,45	7,21	7,14	2,64	31,70	53,48	1,68	10,51	11,58	451,62	0,41	9,12	81,64	3,32	5,53	2784,11	780,90	3565,01	3,43	59,00
	U	±0,17					±0,06	±0,02	±0,02	±0,03	±0,01	±0,13		±0,00	±0,04	±0,37	±0,30	±0,11	±85,48		±85,47		

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A= 6,78 - N=6,8 - U=7,07 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – V) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de ácido octanoico (cerca de 5 g/L).

							Polihidroxialcanoatos							Ramnolipídios									
		MSC	X_R	X_{PHA}	pH		Composição PHA (mol%)					PHA	PHA	Composição RHL (mol%)					Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	(g/L)	(g/L)	(g/L)	In.	Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		1,47	1,44	0,03	7,27	8,57	2,12	23,03	30,59	-	44,26	2,00	29,38	-	6,50	85,80	-	7,72	72,16	-	72,16	-	62,20
	A	±0,05					±2,99	±0,89	±0,65		±2,75	±0,13			±0,01	±0,15		±0,16	±5,26		±5,26		
		1,52	1,24	0,28	7,28	9,01	8,11	80,18	8,28	-	3,44	18,50	281,20	2,78	5,28	82,45	3,76	5,74	291,52	175,28	466,80	1,60	6,20
LFM634	N	±0,30					±0,01	±0,28	±0,13		±0,13	±0,04		±0,06	±0,03	±0,22	±0,23	±0,08	±6,66		±6,66		
		1,60	1,56	0,04	7,31	9,11	-	-	41,87	-	58,13	2,63	42,09	-	-	75,49	-	24,51	19,64	-	19,64	-	27,00
	U	±0,03							±1,72		±1,72	±0,09				±3,32		±3,32	±1,10		±1,10		
		1,75	1,56	0,19	7,27	8,31	-	83,05	11,26	-	5,70	10,98	192,15	0,77	6,50	83,67	3,77	5,31	722,56	522,98	1245,53	1,32	59,50
	A	±0,06						±2,02	±1,44		±0,57	±0,74		±0,02	±0,08	±0,13	±0,00	±0,02	±13,00		±13,00		
		1,46	1,17	0,29	7,28	8,96	8,12	82,91	6,10	-	2,88	20,18	294,63	4,65	9,85	78,06	3,46	3,98	995,31	396,15	1391,46	2,46	64,90
RMP1256	N	±0,01					±0,23	±0,29	±0,06		±0,00	±0,63		±0,08	±0,70	±0,76	±0,01	±0,04	±117,68		±117,68		
		1,88	1,83	0,05	7,31	9,05	-	-	51,73	-	48,28	2,50	47,00	2,01	11,05	74,13	3,20	9,61	114,51	-	114,51	-	64,90
	U	±0,01							±2,78		±2,78	±0,37		±0,62	±0,04	±0,64	±0,10	±0,11	±5,47		±5,47		
		1,39	1,31	0,08	7,27	8,29	7,02	66,72	15,62	-	10,64	5,78	80,34	0,79	5,04	86,00	3,38	4,80	543,20	260,78	803,97	1,99	62,20
	A	±0,01					±0,44	±1,14	±0,24		±0,47	±0,11		±0,04	±0,04	±0,04	±0,06	±0,01	±13,58		±13,58		
		1,67	1,41	0,26	7,28	9,06	7,45	78,81	9,66	-	4,09	15,53	259,35	2,45	7,94	81,48	3,67	4,47	1049,55	447,45	1497,00	2,27	62,20
RMP1315	N	±0,49					±0,02	±0,82	±0,65		±0,19	±0,32		±0,10	±1,36	±1,35	±0,06	±0,06	±15,07		±15,07		
		1,51	1,47	0,04	7,31	9,10	-	-	51,96	-	48,05	2,97	44,85	6,31	7,63	74,71	-	11,37	50,54	-	50,54	-	67,60
	U	±0,04							±1,00		±1,00	±0,11		±2,75	±0,29	±2,17		±0,86	±0,71		±0,71		
		1,53	1,39	0,14	7,27	8,47	6,43	73,40	13,07	-	7,11	8,90	136,17	0,67	5,08	83,59	4,25	6,43	714,95	340,58	1055,53	2,00	62,20
	A	±0,01					±0,91	±1,60	±0,13		±0,55	±0,58		±0,01	±0,08	±0,04	±0,08	±0,01	±31,51		±31,51		
		1,16	0,95	0,21	7,28	9,04	6,89	81,63	8,29	-	3,19	17,82	206,71	3,22	6,09	81,21	3,93	5,56	696,25	289,28	985,52	2,32	63,90
RMP1484	N	±0,54					±0,07	±1,80	±1,37		±0,35	±0,18		±0,06	±0,06	±0,48	±0,35	±0,13	±101,25		±101,25		
		2,13	2,08	0,05	7,31	9,04	2,62	1,69	47,45	-	48,25	2,40	51,12	6,71	8,03	68,52	-	16,75	56,27	-	56,27	-	67,60
	U	±0,16					±3,71	±2,38	±2,64		±3,45	±0,23		±0,03	±0,30	±0,47		±0,13	±2,38		±2,38		
		1,80	1,68	0,12	7,27	8,36	5,66	68,26	15,89	-	10,21	6,55	117,90	1,04	6,45	82,62	3,56	6,35	375,54	226,58	602,11	1,59	59,50
	A	±0,03					±0,08	±0,09	±0,06		±0,08	±0,40		±0,05	±0,18	±0,01	±0,16	±0,03	±12,97		±12,97		
		1,56	1,38	0,18	7,28	9,09	6,57	77,73	10,54	-	5,18	11,30	176,28	1,38	5,13	83,90	3,94	5,67	835,62	340,58	1176,19	2,35	59,50
RMP1486	N	±0,04					±0,15	±1,83	±1,23		±0,45	±0,28		±0,08	±0,01	±0,06	±0,01	±0,00	±73,08		±73,08		
		2,14	2,08	0,06	7,31	9,06	-	2,03	48,26	-	49,72	2,65	56,71	1,89	7,67	73,18	-	17,27	61,69	-	61,69	-	69,20
	U	±0,03						±2,87	±0,53		±3,40	±0,98		±2,67	±0,23	±2,36		±0,08	±0,34		±0,34		

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,85 - N=7,05 - U=7,23 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – VI) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de algodão (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios								
							Composição PHA (mol%)								Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDΔ5	3HDΔ6	3HDd	PHA (%MSC)	PHA (mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDΔ5	3HDΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)
		4,38	3,45	0,93	7,27	6,09	4,38	28,49	44,83	-	11,44	10,85	21,33	934,08	0,73	4,02	81,54	5,13	1,63	6,95	742,87	201,64	944,51	3,54
	A	±0,27					±0,03	±0,06	±0,21		±0,16	±0,04	±0,85		±0,04	±0,07	±3,69	±1,81	±0,08	±1,68	±91,13	±49,37	±140,50	
		1,27	0,98	0,29	7,26	7,67	4,75	39,22	39,87	-	8,08	8,07	23,12	293,59	0,33	3,98	85,80	4,16	-	5,73	1413,37	478,80	1892,18	2,81
LFM634	N	±0,17					±0,07	±0,10	±0,14		±0,07	±0,05	±2,69		±0,03	±0,39	±0,24	±0,23		±0,11	±4,15	±8,06	±3,91	
		1,93	1,45	0,48	7,28	7,85	4,46	34,19	41,52	6,20	3,99	9,64	24,69	476,51	1,56	4,24	80,04	5,63	1,45	7,08	1119,73	277,16	1396,89	3,83
	U	±0,08					±0,01	±0,17	±0,24	±0,33	±0,22	±0,32	±2,46		±0,04	±0,99	±2,01	±1,00	±0,50	±1,46	±113,58	±5,04	±118,62	
		1,42	0,72	0,69	7,27	6,02	3,78	29,24	42,18	-	12,33	12,47	48,93	692,37	0,71	3,34	81,20	5,55	2,25	6,94	1776,58	330,60	2107,18	5,08
	A	±0,18					±0,38	±1,75	±2,66		±0,41	±5,20	±5,50		±0,08	±0,10	±0,76	±0,13	±0,19	±0,52	±22,15	±6,04	±16,10	
		1,89	1,24	0,66	7,26	7,27	4,61	33,70	41,13	-	13,09	7,48	34,68	657,10	1,68	7,56	66,37	6,34	10,21	7,84	2168,07	314,93	2483,00	6,48
RMP1256	N	±0,05					±0,15	±0,58	±0,57		±0,86	±0,43	±1,01		±0,01	±0,00	±1,72	±0,06	±1,51	±0,13	±90,77	±6,05	±84,72	
		2,00	1,25	0,75	7,28	7,54	4,86	31,19	41,69	-	14,05	8,21	37,51	748,34	2,16	7,98	65,72	6,41	10,20	7,53	1855,10	255,08	2110,17	6,86
	U	±0,04					±0,10	±0,14	0,25		±0,51	±0,01	±0,94		±0,14	±0,78	±4,45	±0,72	±3,51	±1,15	±202,67	±4,03	±198,64	
		2,91	2,40	0,51	7,27	6,00	2,51	20,97	50,64	4,38	10,47	11,03	17,52	510,68	0,62	6,14	75,52	5,84	4,30	7,58	891,89	163,16	1055,06	5,93
	A	±0,05					±0,16	±2,53	±0,94	±0,25	±0,84	±0,66	±2,04		±0,02	±1,00	±2,19	±0,07	±0,20	±1,43	±45,04	±79,60	±34,56	
		1,56	0,85	0,71	7,26	7,28	4,19	32,34	43,08	-	13,32	7,06	45,61	711,54	1,77	9,33	69,30	5,67	7,45	6,48	2010,56	349,13	2359,69	5,47
RMP1315	N	±0,01					±0,07	±0,14	±0,05		±0,21	±0,04	±0,11		±0,02	±1,34	±2,33	±0,53	±1,81	±1,35	±134,75	±4,03	±138,78	
		1,58	0,90	0,68	7,28	7,52	4,99	30,59	41,03	-	13,83	9,56	42,86	677,19	2,62	8,86	67,69	5,94	8,83	6,06	1716,87	277,16	1994,03	5,89
	U	±0,06					±0,36	±1,27	±1,39		±1,24	±1,78	±1,97		±0,25	±0,83	±1,07	±0,19	±1,40	±0,55	±282,20	±5,04	±277,17	
		3,00	1,92	1,08	7,27	6,15	2,21	20,33	60,61	3,70	4,39	8,76	36,08	1082,51	0,53	4,63	82,05	6,04	-	6,76	1025,94	188,81	1214,75	5,19
	A	±0,00					±0,14	±0,26	±1,48	±0,25	±1,27	±0,08	±1,43		±0,03	±0,65	±0,64	±1,74		±0,42	±91,57	±15,11	±76,46	
		1,91	1,37	0,54	7,26	7,23	4,15	38,90	37,99	2,04	4,02	12,90	28,04	535,58	0,59	3,09	83,78	5,31	0,75	6,48	1676,81	376,20	2053,02	4,22
RMP1484	N	±0,03					±0,02	±0,07	±0,02	±0,01	±0,01	±0,07	±0,47		±0,04	±0,10	±0,13	±0,02	±0,16	±0,01	±126,08	±4,03	±122,05	
		1,70	1,23	0,48	7,28	7,93	5,12	26,21	43,63	-	15,42	9,62	28,13	479,66	0,52	4,42	81,76	4,54	1,34	7,41	1097,30	220,88	1318,17	4,73
	U	±0,01					±0,10	±0,28	±0,42		±0,84	±0,04	±0,60		±0,50	±0,05	±3,39	±0,68	±0,88	±1,27	±222,41	±8,06	±214,35	
		5,91	4,06	1,85	7,27	5,93	1,25	11,91	72,48	4,38	2,13	7,86	31,31	1850,35	0,72	4,05	83,73	4,37	0,56	6,56	1106,54	152,48	1259,02	6,88
	A	±0,08					±0,06	±1,22	±1,01	±0,19	±0,04	±0,04	±1,01		±0,11	±0,63	±3,32	±1,58	±0,51	±1,75	±163,94	±18,13	±182,08	
		1,55	0,98	0,56	7,26	7,34	3,56	34,30	43,44	3,09	3,83	11,79	36,29	560,62	0,72	4,60	83,69	4,07	0,58	6,34	1576,73	314,21	1890,94	4,78
RMP1486	N	±0,67					±0,06	±0,70	±0,93	±0,15	±0,02	±0,29	±0,24		±0,08	±0,42	±3,16	±1,58	±0,62	±1,29	±227,96	±3,02	±224,94	
		1,52	1,15	0,37	7,28	7,99	3,10	14,63	47,99	-	18,86	12,17	24,53	372,91	1,06	8,72	72,76	4,56	1,71	11,19	1164,19	173,85	1338,04	6,39
	U	±0,01					±4,39	±20,36	±8,32		±7,64	±4,62	±2,50		-	-	-	-	-	-	-	±16,12	±16,12	

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecanoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecanoato · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A= 6,95 - N= 7,14 - U= 7,52 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – VII) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de arroz (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos									Ramnolipídios										
							Composição PHA (mol%)							PHA	PHA	Composição RHL (mol%)							Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		2,40	1,81	0,59	7,17	6,26	0,88	4,46	33,11	42,48	1,58	4,92	12,60	24,59	590,16	-	-	2,73	88,56	2,85	-	5,86	1257,69	666,90	1924,59	1,79	11,10
	A	±0,52					±0,01	±0,06	±0,22	±0,23	±0,18	±0,09	±0,30	±0,57				±0,03	±0,54	±0,13		±0,44	±6,16		±6,16		
		2,60	1,64	0,96	7,18	7,58	0,69	3,60	28,23	43,93	0,97	8,70	13,90	37,09	964,34	-	1,27	7,39	79,23	4,25	2,93	4,94	1466,81	433,20	1900,01	3,24	63,20
LFM634	N	±0,39					±0,05	±0,08	±0,11	±0,06	±1,37	±1,59	±0,08	±1,92			±0,01	±0,13	±0,18	±0,08	±0,04	±0,19	±41,78		±41,79		
		3,70	3,22	0,48	7,22	7,33	-	3,63	23,70	44,27	2,78	7,43	18,20	13,07	483,59	-	-	2,20	86,19	4,20	-	7,42	604,68	259,35	864,03	2,20	62,20
	U	±1,51						±0,09	±0,07	±0,25	±0,30	±0,04	±0,07	±0,24				±0,12	±0,20	±0,13		±0,19	±1,32		±1,32		
		2,33	1,43	0,90	7,17	5,73	0,61	3,96	29,88	43,88	1,14	9,92	10,62	38,42	895,19	-	1,53	6,07	80,70	4,81	-	6,90	1182,98	225,15	1408,13	5,02	62,20
	A	±0,02					±0,01	±0,10	±0,50	±0,91	±1,61	±1,77	±0,16	±1,46			±0,14	±0,98	±3,40	±0,88		±1,03	±18,35		±18,35		
		2,48	1,58	0,90	7,18	7,32	-	4,07	31,94	43,35	-	10,34	10,32	36,31	900,49	-	1,56	5,58	77,74	5,43	4,69	5,02	1709,46	293,55	2003,01	5,53	62,20
RMP1256	N	±0,05						±0,06	±0,08	±0,04		±0,06	±0,04	±1,06			±0,06	±0,23	±0,45	±0,28	±0,16	±0,28	±24,94		±24,94		
		4,00	3,26	0,74	7,22	7,32	-	3,75	25,52	46,94	3,04	5,21	15,54	18,45	738,00	-	0,43	3,93	84,78	4,01	-	6,87	1186,70	575,70	1762,40	1,96	2,70
	U	±0,10						±0,35	±2,44	±3,83	±0,37	±0,66	±0,74	±0,30			±0,00	±0,02	±0,35	±0,21		±0,12	±27,38		±27,38		
		2,13	1,23	0,90	7,17	5,90	-	3,83	30,32	45,64	2,73	7,61	9,89	42,03	895,24	-	0,61	4,96	84,89	3,06	-	6,49	1316,16	324,90	1641,06	3,87	62,20
	A	±0,08						±0,05	±0,02	±0,40	±0,15	±0,03	±0,29	±1,73			±0,03	±0,22	±0,88	±0,18		±0,45	±51,61		±51,61		
		2,39	1,55	0,84	7,18	7,33	0,26	4,00	31,53	44,09	-	9,62	10,52	35,11	839,13	0,21	1,78	5,93	78,77	4,49	4,52	4,32	2074,36	399,00	2473,36	4,96	64,90
RMP1315	N	±0,04					±0,37	±0,02	±0,40	±0,36		±0,09	±0,33	±6,05		±0,03	±0,05	±0,00	±0,25	±0,07	±0,19	±0,02	±38,04		±38,04		
		3,80	3,24	0,56	7,22	7,34	-	4,07	28,69	46,09	2,16	4,20	14,81	14,62	555,56	-	0,32	2,91	85,08	4,20	-	7,51	1043,70	428,93	1472,62	2,30	0,00
	U	±0,11						±0,31	±0,16	±0,57	±0,08	±0,11	±0,08	±0,41			±0,01	±0,21	±1,34	±0,44		±0,69	±1,32		±1,32		
		4,45	2,93	1,52	7,17	6,08	-	2,22	19,78	63,07	3,31	2,58	9,05	34,16	1520,12	-	0,57	3,79	87,41	2,99	-	5,25	719,85	168,15	888,00	4,08	8,11
	A	±0,29						±0,41	±2,98	±4,31	±0,11	±0,52	±0,51	±0,56			±0,03	±0,07	±0,43	±0,21		±0,33	±127,04		±127,04		
		2,07	1,41	0,66	7,18	7,44	-	3,60	36,96	41,72	2,17	2,45	13,11	31,69	655,98	-	1,07	7,98	78,38	4,21	0,87	7,50	1400,77	390,45	1791,22	3,43	57,90
RMP1484	N	±0,01						±0,04	±0,38	±0,05	±0,55	±0,06	±0,12	±0,38			±0,04	±0,20	±1,03	±0,69	±0,25	±0,33	±32,68		±32,68		
		4,23	3,87	0,36	7,22	7,24	-	3,95	31,50	42,63	0,62	2,85	18,47	8,54	361,24	-	0,34	4,20	83,67	4,00	-	7,81	912,60	522,98	1435,58	1,66	36,80
	U	±0,03						±0,33	±1,05	±1,32	±0,88	±0,08	±0,21	±0,17			±0,01	±0,02	±0,14	±0,08		±0,06	±63,71		±63,71		
		3,21	2,15	1,06	7,17	6,25	0,75	3,69	29,16	48,14	2,36	5,15	10,78	32,88	1055,45	-	0,30	2,98	87,92	3,43	-	5,38	1053,91	265,05	1318,96	3,78	5,41
	A	±0,05					±0,01	±0,11	±0,42	±0,13	±0,19	±0,09	±0,06	±0,66			±0,00	±0,02	±0,57	±0,18		±0,37	±26,50		±26,50		
		2,74	1,81	0,93	7,18	7,49	0,88	3,98	29,72	42,78	2,62	5,91	14,13	33,96	930,50	-	1,20	9,19	75,63	4,25	2,66	7,09	1476,76	225,15	1701,91	6,27	59,50
RMP1486	N	±0,14					±0,05	±0,00	±0,21	±0,01	±0,01	±0,13	±0,16	±1,23			±0,02	±0,33	±0,25	±0,22	±0,04	±0,33	±26,11		±26,11		
		3,00	2,74	0,26	7,22	7,27	-	3,38	30,38	42,67	-	3,82	19,76	8,59	257,70	-	0,39	4,06	82,97	4,53	-	8,06	673,46	133,95	807,41	4,76	60,50
	U	±0,15						±0,08	±0,36	±0,74		±0,49	±0,04	±0,28			±0,04	±0,21	±1,08	±0,14		±0,69	±7,22		±7,22		

MSC – Massa seca celular · 3HB - 3-hidroxibutirato · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,98 - N=7,20 - U=7,52 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – VIII) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de canola (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios									
		MSC	X_R	X_{PHA}	pH		Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	(g/L)	(g/L)	(g/L)	In.	Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		3,79	3,38	0,41	7,18	6,04	3,37	25,94	51,50	-	8,31	10,90	26,94	1021,03	-	7,87	92,13	-	-	-	215,64	-	215,64	-	59,50
	A	±0,08					±0,45	±2,81	±3,46		±0,33	±0,13	±0,74			±1,34	±1,34				±16,39		±16,39		
		2,06	1,82	0,24	7,21	7,12	4,89	37,91	35,51	-	9,89	11,81	27,00	556,20	2,40	13,17	71,64	3,26	4,23	5,32	1331,63	279,30	1610,93	4,62	63,90
LFM634	N	±0,01					±0,12	±0,62	±0,38		±0,00	±0,11	±2,44		±0,05	±0,25	±0,16	±0,04	±0,04	±0,04	±13,74		±13,74		
		3,64	2,91	0,73	7,24	7,06	4,10	31,03	39,09	-	5,73	20,06	7,04	256,26	-	4,31	78,24	5,52	-	11,94	575,57	200,93	776,49	2,69	59,46
	U	±0,10					±0,08	±0,12	±0,09		±0,06	±0,18	±0,03			±0,13	±0,69	±0,25		±1,08	±30,09		±30,10		
		2,30	2,10	0,20	7,18	6,09	5,26	38,41	36,98	-	10,72	8,64	26,21	602,83	2,06	5,09	80,04	6,93	-	5,90	880,47	293,55	1174,02	2,86	59,50
	A	±0,01					±0,06	±0,06	±0,01		±0,01	±0,00	±0,18		±0,02	±0,30	±0,47	±0,59		±0,20	±57,50		±57,50		
		1,91	1,69	0,22	7,21	7,11	4,62	29,77	40,54	-	13,78	11,31	25,38	484,76	1,01	12,00	68,95	3,49	-	6,13	3152,13	525,83	3677,96	5,72	63,20
RMP1256	N	±0,06					±0,31	±0,08	±0,18		±0,44	±0,23	±0,17		±0,01	±0,00	±0,01	±0,00		±0,04	±49,21		±49,22		
		4,25	3,95	0,30	7,24	7,28	3,61	20,08	62,68	-	6,67	6,98	14,25	605,63	-	2,34	85,43	4,78	-	7,46	1291,70	561,45	1853,15	2,17	2,70
	U	±0,35					±1,48	±1,96	±18,47		±5,18	±9,86	±0,35			±0,02	±0,37	±0,13		±0,49	±14,76		±14,76		
		3,30	3,01	0,29	7,18	5,59	5,05	31,62	46,44	-	8,03	8,87	21,77	718,41	4,38	8,24	75,65	8,77	-	2,96	440,73	156,75	597,48	2,72	55,60
	A	±0,06					±1,77	±7,02	±9,44		±0,57	±0,09	±4,82		±0,58	±3,15	±1,93	±3,54		±4,19	±22,09		±22,09		
		1,97	1,74	0,23	7,21	7,08	4,85	29,38	40,11	-	14,07	11,59	26,08	513,78	1,46	14,48	66,17	3,39	8,80	5,71	2620,61	324,90	2945,51	7,74	62,20
RMP1315	N	±0,23					±0,42	±0,17	±0,08		±0,07	±0,08	±0,42		±0,03	±0,04	±0,06	±0,01	±0,01	±0,06	±16,24		±16,25		
		3,78	3,18	0,60	7,24	7,26	8,36	23,75	43,35	-	8,79	15,76	8,62	325,84	-	2,07	85,19	5,19	-	7,56	1231,81	454,58	1686,39	2,56	44,44
	U	±0,09					±3,10	±1,39	±0,47		±0,04	±1,20	±0,25			±0,01	±0,29	±0,08		±0,23	±11,23		±11,23		
		5,75	5,34	0,41	7,18	5,87	1,85	14,45	70,35	-	6,29	7,06	31,15	1791,13	4,32	10,33	66,99	18,36	-	-	443,54	-	443,54	-	58,30
	A	±0,16					±0,10	±0,64	±1,05		±0,35	±0,04	±0,73		±0,33	±0,66	±1,23	±1,57			±26,25		±26,25		
		2,37	2,09	0,28	7,21	7,15	5,30	36,93	39,22	-	6,60	11,98	29,93	709,34	1,44	8,14	76,90	3,94	2,88	6,73	1490,19	293,55	1783,74	4,85	62,20
RMP1484	N	±0,47					±0,37	±0,29	±0,27		±0,13	±0,22	±1,17		±0,04	±0,21	±0,19	±0,08	±0,04	±0,03	±15,70		±15,70		
		4,40	3,74	0,66	7,24	7,02	6,79	31,48	40,41	-	6,30	15,04	12,23	538,12	0,41	4,43	79,93	4,63	-	10,60	1073,79	253,65	1351,55	4,09	59,46
	U	±0,10					±0,74	±0,56	±0,87		±0,15	±0,54	±0,01		±0,01	±0,16	±2,55	±0,59		±3,29	±13,15		±47,25		
		5,69	5,26	0,43	7,18	6,00	2,21	17,13	65,94	-	6,95	7,64	32,87	1870,30	4,32	10,33	66,99	18,36	-	-	462,11	-	462,11	-	48,60
	A	±0,10					±0,08	±0,15	±0,53		±0,11	±0,03	±0,57		±0,33	±0,66	±1,23	±1,57			±26,25		±26,25		
		2,00	1,76	0,24	7,21	7,08	5,02	38,62	38,32	-	5,92	12,14	26,72	534,40	2,38	11,52	72,31	3,71	3,26	6,85	1130,88	169,58	1300,46	6,43	59,50
RMP1486	N	±0,00					±0,21	±0,47	±0,33		±0,35	±0,25	±0,98		±0,05	±0,15	±0,47	±0,27	±0,15	±0,04	±28,50		±28,50		
		2,78	2,04	0,74	7,24	7,16	3,19	26,12	44,18	-	-	26,52	5,35	148,73	-	4,15	77,75	4,48	-	13,64	507,41	139,65	647,06	3,41	59,46
	U	±1,13					±4,51	±0,52	±4,99			±0,04	±0,78			±0,15	±2,01	±0,08		±2,07	±34,15		±34,15		

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,90 - N=7,05 - U=7,48 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – IX) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de coco (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios								
							Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDΔ5	3HDΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDΔ5	3HDΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)
		2,50	1,88	0,61	7,19	6,39	5,04	40,60	53,07	0,54	-	0,75	24,64	614,70	-	2,21	97,79	-	-	***	718,70	401,14	1119,84	1,72
	A	±0,01					±0,13	±0,15	±0,03	±0,01		±0,00	±2,47			±0,07	±0,07				±4,13	±5,04	±9,17	
		1,38	0,82	0,56	7,22	7,80	5,25	44,62	48,87	0,53	-	0,73	40,53	561,41	0,88	5,20	93,92	-	-	***	862,70	55,58	918,28	15,71
LFM634	N	±0,15					±0,03	±0,21	±0,13	±0,04		±0,07	±0,12		±0,02	±0,06	±0,04				±4,15	±16,12	±20,27	
		1,98	1,27	0,71	7,25	8,01	5,94	47,41	46,21	-	-	0,44	35,66	706,14	2,07	4,74	82,96	-	-	10,23	897,54	64,13	961,67	13,58
	U	±0,04					±0,09	±0,17	±0,04			±0,13	±3,08		±0,03	±0,08	±0,72			±0,68	±16,11	±10,06	±6,03	
		0,87	0,44	0,43	7,19	6,11	4,78	40,26	54,50	-	-	0,47	49,16	427,70	3,21	17,39	74,21	-	-	5,19	1848,78	126,11	1974,89	14,67
	A	±0,07					±0,02	±0,13	±0,05			±0,06	±3,10		±0,04	±0,92	±0,23			±1,19	±101,02	±23,18	±124,19	
		1,86	0,96	0,90	7,22	7,49	5,34	43,11	50,83	0,26	-	0,47	48,26	897,68	4,93	15,93	70,64	1,41	-	7,09	2182,79	158,18	2340,96	13,65
RMP1256	N	±0,10					±0,09	±0,08	±0,15	±0,01		±0,02	±4,00		±0,10	±0,18	±4,30	±2,00		±2,58	±61,80	±8,06	±53,73	
		1,46	0,68	0,78	7,25	7,69	5,20	41,13	52,03	0,56	-	1,07	53,52	784,01	7,44	22,93	65,06	0,43	-	4,14	1702,33	66,98	1769,31	25,78
	U	±0,02					±0,02	±0,03	±0,13	±0,06		±0,12	±0,77		±0,08	±0,13	±0,03	±0,07		±0,03	±23,48	±0,00	±23,48	
		0,40	0,25	0,14	7,19	6,10	3,22	28,76	63,59	-	-	4,43	36,02	142,29	3,54	19,76	69,48	0,19	-	7,04	2063,49	19,24	2082,73	114,68
	A	±0,04					±0,16	±1,67	±1,67			±0,16	±1,87		±0,14	±0,41	±0,39	±0,05		±0,22	±70,22	±7,05	±63,17	
		1,82	1,26	0,56	7,22	7,80	5,27	43,69	50,10	0,41	-	0,53	30,65	557,84	0,61	4,60	88,37	2,59	-	3,84	1265,41	407,55	1672,97	2,98
RMP1315	N	±0,04					±0,06	±0,16	±0,15	±0,04		±0,03	±0,95		±0,01	±0,14	±8,72	±3,66		±5,21	±116,72	±8,06	±108,66	
		1,57	1,12	0,45	7,25	8,08	5,97	43,07	49,38	0,65	-	0,93	28,55	448,16	1,12	5,09	75,21	-	-	18,59	533,53	116,14	649,67	4,31
	U	±0,00					±0,16	±0,17	±0,37	±0,02		±0,02	±1,18		±0,20	±0,76	±11,36			±12,32	±75,65	±5,03	±80,69	
		1,29	0,82	0,46	7,19	6,09	2,71	25,88	69,63	-	-	1,78	35,96	462,09	3,63	17,81	76,40	0,20	-	1,96	1305,64	294,26	1599,91	4,42
	A	±0,01					±0,22	±2,49	±2,54			±0,17	±0,13		±0,04	±0,23	±1,11	±0,00		±0,84	±84,95	±15,11	±100,07	
		1,63	1,03	0,60	7,22	7,28	5,01	44,55	49,21	0,36	-	0,88	36,85	600,62	5,01	19,73	71,78	0,39	-	3,09	1480,88	96,19	1577,07	15,75
RMP1484	N	±0,04					±0,03	±0,08	±0,10	±0,01		±0,04	±1,72		±0,03	±0,05	±0,06	±0,03		±0,10	±7,35	±19,14	±11,79	
		3,09	1,86	1,23	7,25	7,62	4,66	34,15	49,92	0,09	-	11,18	39,77	1228,83	5,31	23,49	70,59	0,60	-	***	1104,84	201,64	1306,48	5,58
	U	±0,01					±0,03	±0,35	±0,06	±0,12		±0,45	±1,61		±0,01	±0,20	±0,17	±0,02			±34,75	±13,09	±21,65	
		1,76	1,18	0,58	7,19	6,15	3,48	28,62	65,29	-	-	2,61	33,01	582,66	2,87	11,93	82,30	0,27	-	2,62	1238,15	102,60	1340,75	11,84
	A	±0,16					±0,08	±0,60	±0,36			±0,31	±0,22		±0,19	±1,60	±1,13	±0,05		±0,24	±165,03	±6,05	±171,08	
		1,69	1,06	0,63	7,22	7,49	4,89	41,32	52,39	0,33	-	1,08	37,20	628,61	3,37	15,52	77,40	0,08	-	3,63	1629,85	112,57	1742,43	14,65
RMP1486	N	±0,06					±0,02	±0,27	±0,08	±0,08		±0,29	±0,15		±0,11	±0,34	±1,16	±0,12		±1,49	±63,90	±22,167	±41,74	
		1,73	1,17	0,56	7,25	7,96	5,59	39,00	54,06	0,28	-	1,07	32,21	557,16	1,09	6,24	86,10	-	-	6,58	1244,46	2,85	1247,31	226,95
	U	±0,04					±0,15	±0,21	±0,10	±0,10		±0,16	±0,41		±0,04	±0,29	±1,37			±1,71	±25,62	±4,03	±21,59	

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecanoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecanoato · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A= 7,00 - N= 7,44 - U= 7,17 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final · *** : deleção dos valores devido a interferências da fonte de carbono na análise

Anexo A – X) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de girassol (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios									
							Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição RHL (mol%)							Concentração (mg/L)			3HA/Ram
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)
		8,70	6,80	1,89	7,27	6,14	2,76	18,54	57,34	13,41	-	7,95	21,79	1894,82	-	1,26	5,43	79,88	4,16	2,78	6,49	1110,06	409,10	1519,15	2,65
	A	±0,19					±0,14	±0,74	±4,41	±2,59		±0,94	±1,31			±0,13	±3,46	±1,93	±0,52	±2,08	±0,94	±205,12	±66,34	±138,78	
		1,67	1,25	0,42	7,28	7,48	3,58	34,78	43,86	7,06	3,55	7,17	25,11	418,11	-	0,71	2,27	87,29	3,50	0,74	5,49	1549,09	567,63	2116,72	2,59
LFM634	N	±0,12					±0,51	±5,49	±5,53	±7,21	±5,02	±1,72	±0,25			±0,13	±2,31	±2,31	±0,05	±0,03	±0,11	±87,77	±5,04	±92,81	
		1,19	0,82	0,37	7,31	6,76	3,37	36,56	38,58	8,65	-	12,85	30,71	365,44	-	1,28	7,80	79,13	3,52	1,30	6,96	982,53	179,31	1161,85	5,25
	U	±0,17					±0,17	±1,80	±1,07	±0,71		±1,99	±0,11		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2,46	1,59	0,87	7,27	5,97	3,63	27,54	45,32	8,48	5,45	9,57	35,30	868,31	-	0,49	2,81	81,41	4,50	2,82	7,96	1390,34	293,31	1683,66	4,47
	A	±0,03					±0,43	±1,61	±3,39	±8,80	±7,70	±4,34	±8,53			±0,03	±0,21	±5,47	±1,30	±1,32	±3,09	±136,98	±3,36	±133,62	
		2,12	1,19	0,93	7,28	7,20	3,90	30,48	40,53	15,86	-	9,23	43,78	928,04	-	1,70	6,19	72,39	5,60	8,16	5,96	2182,93	405,53	2588,47	5,09
RMP1256	N	±0,05					±0,19	±2,00	±0,11	±0,15		±2,45	±0,85			±0,02	±0,47	±1,05	±0,14	±0,12	±0,28	±29,49	±2,52	±32,00	
		2,08	1,24	0,84	7,31	7,45	4,31	29,10	43,28	8,36	6,11	8,84	40,52	844,81	-	1,84	5,49	72,29	5,79	7,53	7,06	1961,39	499,94	2461,33	3,70
	U	±0,18					±0,26	0,23	±1,07	±9,22	±8,63	±0,96	±1,30			±0,12	±0,49	±3,39	±1,79	±0,84	±1,37	±174,97	±1,68	±176,65	
		2,31	1,29	1,02	7,27	5,89	3,72	29,61	43,15	15,74	-	7,78	44,19	1020,76	-	0,73	3,13	78,98	4,77	3,81	8,58	1768,43	309,35	2077,78	5,37
	A	±0,07					±0,02	0,60	±0,09	±2,45		±2,98	±1,45			±0,12	±0,22	±5,64	±0,99	±1,41	±3,58	±187,84	±2,52	±190,36	
		2,03	1,09	0,94	7,28	7,02	4,04	32,64	44,79	7,63	5,21	5,69	46,33	938,11	0,69	2,04	5,98	71,82	5,44	8,11	5,92	1940,64	399,60	2340,23	4,61
RMP1315	N	±0,08					±0,34	±1,54	±0,57	±7,97	±7,37	±0,71	±6,22		±0,03	±0,06	±0,38	±3,39	±1,64	±0,61	±1,63	±145,42	±31,07	±176,49	
		2,41	1,38	1,03	7,31	7,51	4,38	29,69	38,76	15,56	-	11,61	42,69	1031,02	-	2,92	8,11	66,82	6,77	9,89	5,49	1841,29	366,94	2208,23	4,85
	U	±0,12					±0,25	±0,07	±0,79	±1,41		±0,94	±3,49			±0,17	±0,67	±4,27	±3,65	±0,54	±0,92	±183,46	±89,01	±272,47	
		3,65	2,85	0,79	7,27	6,09	2,27	17,89	53,05	12,35	-	14,44	21,78	793,87	-	-	13,37	50,23	30,70	-	5,70	142,87	-	142,87	-
	A	±0,66					±0,34	±3,19	±4,07	±3,44		±4,16	±2,48				±12,34	±39,12	±43,40		±8,06	±139,02		±139,02	
		2,22	1,61	0,60	7,28	7,09	4,12	12,11	59,93	4,73	2,06	17,05	27,12	600,63	-	0,87	3,49	86,34	3,24	0,44	5,62	1612,24	353,88	1966,12	4,34
RMP1484	N	±0,63					±2,20	±15,28	±18,50	±2,91	±2,92	±5,44	±5,17			±0,03	±0,05	±0,06	0,00	±0,00	±0,02	±6,62	±10,08	±3,45	
		2,37	1,84	0,52	7,31	7,78	4,83	39,28	44,48	5,80	-	5,60	22,10	522,59	-	2,07	5,38	76,72	4,99	3,32	7,51	1263,01	451,85	1714,86	2,66
	U	±0,98					±1,38	±3,88	±10,87	±8,21		±7,92	±3,66			±0,01	±0,01	±1,92	±0,78	±0,43	±0,71	±4,18	±10,92	±15,09	
		6,27	4,72	1,55	7,27	5,61	1,91	12,70	45,50	10,00	-	29,90	24,74	1551,12	19,55	10,12	12,77	57,56	-	-	-	50,14	-	50,14	-
	A	±0,06					±0,28	±0,83	±5,44	±3,59		±2,96	±4,08		±0,65	±0,21	±1,09	±0,65				±4,56		±4,56	
		1,79	1,26	0,53	7,28	7,66	3,04	25,74	43,79	12,18	3,72	11,52	29,80	533,35	-	-	3,70	86,72	3,57	-	6,01	1593,43	458,38	2051,80	3,30
RMP1486	N	±0,45					±0,44	±2,91	±10,99	±13,77	±5,27	±5,84	±6,12			-	±0,01	±0,29	±0,09		±0,18	±27,08	-	±27,08	
		1,70	1,12	0,58	7,31	7,27	3,78	33,77	47,66	3,72	0,99	10,08	34,26	584,14	-	1,25	4,13	84,91	3,56	0,20	5,95	1650,69	369,91	2020,60	4,45
	U	±0,11					±0,23	±0,11	±1,43	±2,50	±1,39	±0,44	±4,55			±0,03	±0,26	±0,42	±0,05	±0,28	±0,03	±4,82	±106,64	±101,82	

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A= 6,96 - N=7,16 - U= 7,46 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – XI) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de linhaça (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios									
							Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		4,79	3,58	1,21	7,18	5,91	2,19	18,19	70,26	3,41	1,51	4,45	25,28	1210,91	1,17	3,89	84,48	3,94	-	6,54	401,27	182,40	583,67	2,10	58,30
	A	±0,37					±0,28	±1,06	±11,56	±1,79	±2,14	±6,29	±2,42		±0,09	±0,23	±0,47	±0,21		±0,59	±15,05		±15,06		
		2,07	1,55	0,52	7,20	7,33	5,21	39,60	40,66	0,56	13,56	0,43	25,30	523,71	1,60	7,38	77,10	4,41	4,28	5,26	2076,66	394,73	2471,38	5,02	59,50
LFM634	N	±0,02					±0,17	±0,87	±0,62	±0,79	±0,25	±0,61	±1,59		±0,04	±0,01	±0,37	±0,18	±0,13	±0,02	±164,62		±164,62		
		4,03	3,52	0,51	7,24	7,23	3,82	30,02	45,17	0,50	12,71	7,80	12,58	506,97	0,53	3,66	84,80	3,98	0,21	6,83	2338,94	890,63	3229,57	2,49	59,46
	U	±0,01					±1,15	±4,67	±2,09	±0,71	±2,43	±11,03	±4,33		±0,08	±0,03	±0,13	±0,01	±0,00	±0,18	±89,05		±89,05		
		3,45	2,41	1,04	7,18	5,80	4,61	31,80	44,14	-	12,22	7,23	30,08	1037,76	7,97	11,44	48,70	3,45	21,81	4,01	572,96	218,03	790,98	2,51	8,11
	A	±0,04					±0,40	±6,68	±7,81		±0,52	±0,20	±6,17		±0,93	±1,58	±1,65	±4,88	±5,87	±0,44	±13,71		±13,71		
		2,14	1,51	0,63	7,20	7,25	4,33	28,93	41,81	-	14,77	10,17	29,62	633,87	0,87	8,91	70,13	4,94	8,77	6,38	3799,16	542,93	4342,09	6,62	62,20
RMP1256	N	±0,00					±0,09	±0,00	±0,12		±0,30	±0,33	±3,47		±0,05	±0,04	±0,54	±0,20	±0,23	±0,03	±40,36		±40,37		
		4,30	3,39	0,91	7,24	7,36	3,41	21,81	52,99	-	10,45	6,86	21,19	911,17	0,69	3,84	83,15	4,69	0,73	6,90	1759,01	430,35	2189,36	3,88	51,35
	U	±0,09					±0,90	±4,97	±8,58		±1,46	±7,61	±3,32		±0,25	±0,17	±0,40	±0,34	±0,06	±0,08	±10,22		±10,22		
		2,57	1,75	0,82	7,18	6,02	4,35	30,22	42,70	-	14,51	8,23	31,81	817,52	0,59	3,32	83,26	5,35	1,18	6,31	1545,95	377,63	1923,58	3,88	56,80
	A	±0,04					±0,09	±0,26	±0,83		±0,45	±0,03	±3,05		±0,21	±0,13	±1,44	±0,18	±0,47	±0,47	±24,35		±24,35		
		2,07	1,47	0,60	7,20	7,15	4,41	29,11	41,44	-	15,05	10,00	28,96	599,47	1,01	10,26	67,80	5,09	9,42	6,44	3821,94	407,55	4229,49	8,88	58,30
RMP1315	N	±0,01					±0,01	±0,25	±0,19		±0,06	±0,00	±3,95		±0,04	±0,06	±1,42	±0,58	±0,40	±0,47	±85,70		±85,70		
		4,05	3,33	0,72	7,24	7,43	4,73	25,71	46,24	-	10,32	13,00	17,86	723,33	0,66	3,58	80,74	4,99	1,18	8,87	1328,88	246,53	1575,41	5,09	10,81
	U	±0,01					±0,34	±0,28	±0,17		±0,18	±0,03	±2,56		±0,13	±0,03	±3,25	±0,70	±0,73	±1,65	±51,36		±51,36		
		5,01	3,96	1,05	7,18	5,92	2,98	23,18	58,06	4,33	2,15	9,32	20,92	1048,09	6,79	17,17	43,93	3,42	17,92	7,06	94,61	-	94,61	-	2,70
	A	±0,47					±0,04	±0,33	±0,30	±0,12	±0,16	±0,02	±0,79		±1,21	±3,75	±11,70	±4,84	±16,96	±0,16	±27,74		±27,74		
		2,30	1,54	0,76	7,20	7,28	4,68	34,37	41,31	-	8,99	10,66	33,12	761,76	1,05	5,74	76,95	5,56	3,56	7,16	1800,38	304,95	2105,33	5,59	59,50
RMP1484	N	±0,04					±0,35	±0,31	±0,53		±0,19	±0,30	±1,97		±0,01	±0,00	±0,07	±0,13	±0,04	±0,03	±40,01		±40,00		
		4,99	4,21	0,78	7,24	7,33	3,86	31,42	41,57	-	11,25	11,90	15,56	776,44	0,43	3,47	83,90	4,72	-	7,48	1497,26	585,68	2082,93	2,42	59,46
	U	±0,11					±0,05	±0,27	±0,32		±0,07	±0,06	±0,31		±0,03	±0,01	±0,07	±0,02		±0,07	±26,34		±26,34		
		4,07	2,70	1,37	7,18	6,19	3,18	22,44	57,46	3,67	5,51	7,75	33,78	1374,85	1,13	3,72	84,61	4,31	0,53	5,72	900,37	253,65	1154,02	3,38	10,80
	A	±0,22					±0,51	±2,06	±3,47	±0,12	±0,85	±0,18	±1,01		±0,02	±0,00	±0,14	±0,12	±0,02	±0,02	±3,76		±3,76		
		2,30	1,68	0,62	7,20	7,34	4,48	36,15	39,68	-	8,39	11,32	26,93	619,39	1,20	5,19	79,49	5,14	2,53	6,46	1485,95	310,65	1796,60	4,54	59,50
RMP1486	N	±0,01					±0,04	±0,69	±0,42		±0,23	±0,56	±5,60		±0,11	±0,10	±0,08	±0,33	±0,21	±0,18	±115,31		±115,31		
		5,23	4,15	1,08	7,24	7,31	4,17	33,29	40,32	-	11,17	11,07	20,63	1078,95	0,31	3,16	84,26	4,52	0,09	7,67	1563,61	420,38	1983,99	3,52	62,16
	U	±0,08					±0,01	±0,35	±0,64		±0,01	±0,29	±0,53		±0,04	±0,03	±0,07	±0,08	±0,12	±0,34	±24,96		±24,96		

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,90 - N=7,05 - U=7,48 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – XII) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de mamona (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios									
							Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)				3HA/Ram	E24
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		1,70	1,61	0,09	7,23	4,75	4,68	19,65	37,49	9,34	-	28,85	5,26	89,50	-	17,15	-	14,47	-	18,38	3,37	12,11	15,48	0,24	54,05
	A	±0,04					±0,82	±2,55	±6,96	±3,85		±6,47	±0,86			±24,25		±20,47		±25,99	±4,77	±1,01	±5,77		
		3,77	3,57	0,20	7,25	8,89	3,86	21,73	40,63	7,76	-	26,03	5,24	197,57	5,36	15,18	67,64	-	-	11,82	88,72	25,65	114,37	3,40	48,65
LFM634	N	±0,13					±0,65	±1,48	±1,71	±0,08		±3,93	±0,19		±2,63	±0,38	±3,89			±0,89	±7,68	±0,00	±7,68		
		1,99	1,91	0,08	7,28	7,49	3,62	4,33	16,93	22,10	-	53,02	4,11	81,81	-	-	44,80	-	-	55,20	12,00	8,55	20,55	1,67	2,70
	U	±0,21					±0,39	±0,75	±2,84	±10,09		±6,11	±0,60				±8,66			±8,66	±0,39	±6,05	±5,66		
		1,01	0,94	0,07	7,23	6,11	1,48	1,96	16,67	32,86	-	47,03	6,60	66,63	26,27	62,43	11,30	-	-	-	1,93	12,11	14,05	0,20	27,78
	A	±0,04					±2,09	±2,77	±2,95	±0,81		±1,09	±0,09		±37,15	±53,14	±15,99				±1,43	±1,01	±0,42		
		2,04	1,91	0,13	7,25	7,50	4,95	28,82	40,07	4,02	-	22,15	6,43	131,16	11,42	2,96	74,38	-	-	11,24	31,72	58,43	90,15	0,53	59,46
RMP1256	N	±0,06					±0,26	±3,07	±4,89	±1,67		±6,55	±1,13		±1,02	±4,19	±10,69			±15,89	±7,17	±4,03	±11,20		
		0,73	0,70	0,03	7,28	8,16	2,29	6,80	18,66	19,69	-	52,55	3,64	26,59	-	-	75,21	-	-	24,79	6,94	11,40	18,34	0,58	10,81
	U	±0,08					±3,24	±1,91	±4,45	±0,66		±3,77	±1,26				±35,06			±35,06	±3,34	±2,02	±1,32		
		1,59	1,54	0,05	7,23	5,34	4,61	5,61	29,42	17,03	-	43,33	3,00	47,73	-	50,00	4,84	-	-	45,16	11,66	12,83	24,48	0,77	8,11
	A	±0,06					±1,76	±1,26	±6,83	±9,25		±0,61	±0,59			±70,72	±6,84			±63,87	±15,43	±0,00	±15,43		
		2,40	2,30	0,10	7,25	8,20	4,01	10,86	23,62	15,82	-	45,68	4,03	96,61	4,89	6,32	53,36	14,10	-	21,33	72,63	91,91	164,55	0,72	62,16
RMP1315	N	±0,06					±0,36	±1,99	±4,37	±0,85		±6,66	±0,95		±1,92	±2,70	±27,02	±19,93		±11,71	±40,69	±5,04	±45,73		
		1,38	1,34	0,04	7,28	7,90	3,80	6,67	22,74	14,46	-	52,32	2,84	39,20	-	-	100,00	-	-	-	4,75	9,26	14,01	1,69	32,43
	U	±0,08					±0,33	±0,20	±1,24	±0,64		±1,75	±0,17				±0,00				±0,20	±11,08	±11,28		
		1,33	1,28	0,05	7,23	5,32	3,28	10,91	27,45	18,35	-	40,01	3,72	49,51	-	100,00	-	-	-	-	1,12	7,84	8,96	0,21	27,03
	A	±0,02					±0,37	±0,25	±1,26	±3,84		±1,97	±0,07			±0,00					±0,06	±5,038	±4,98		
		3,56	3,22	0,34	7,25	8,94	2,69	22,33	46,91	9,10	-	18,96	9,56	340,42	0,94	4,94	79,63	4,34	-	10,14	376,84	148,91	525,75	2,34	59,46
RMP1484	N						±0,21	±2,07	±4,05	±5,55		±0,78	±0,95		-	-	-	-		-	-	±5,04	-		
		3,03	2,89	0,14	7,28	8,60	3,96	17,99	31,50	9,37	-	37,19	4,59	139,05	6,35	15,55	25,83	12,78	-	39,50	66,25	44,18	110,43	1,39	2,70
	U	±0,08					±0,30	±2,24	±3,53	±3,50		±2,56	±0,40		±0,30	±0,57	±4,46	±2,55		±1,03	±1,59	±4,03	±5,62		
		0,96	0,92	0,04	7,23	5,81	4,36	6,99	19,30	24,78	-	44,56	4,34	41,71	-	5,19	15,06	39,11	-	40,63	30,85	6,41	37,26	6,16	48,65
	A	±0,09					±0,54	±0,64	±2,26	±10,67		±7,23	±0,91			±0,60	±11,55	±8,43		±20,58	±3,15	±5,04	±1,89		
		2,07	2,00	0,07	7,25	9,39	2,03	2,45	35,54	13,66	-	46,32	3,44	71,16	4,88	5,40	54,88	8,74	-	26,10	67,18	75,53	142,70	0,83	59,46
RMP1486	N	±0,51					±2,87	±0,01	±5,27	±7,77		±5,36	±0,60		±0,24	±0,65	±12,78	±8,03		±5,64	±7,03	±0,00	±7,03		
		2,27	2,11	0,16	7,28	8,61	4,33	28,86	36,16	6,56	-	24,08	6,91	156,95	4,22	7,87	17,48	22,68	-	47,76	103,28	88,35	191,63	1,03	62,16
	U	±0,01					±0,04	±3,75	±4,45	±4,66		±3,49	±1,09		±0,52	±0,16	±1,93	±0,80		±0,45	±14,93	±8,06	±22,99		

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,48 - N=7,00 - U= 8,22 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – XIII) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de milho (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos								Ramnolipídios								
							Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)
		3,12	2,09	1,03	7,21	6,06	3,31	28,30	50,91	3,96	4,53	8,99	32,89	1026,26	-	3,65	84,80	4,32	0,38	6,85	1089,39	552,90	1642,29	1,87
	A	±0,17					±0,06	±0,45	±0,94	±0,31	±0,07	±0,17	±1,06			±0,03	±0,17	±0,46	±0,54	±0,11	±51,14	±10,08	±41,06	
		1,70	1,12	0,57	7,23	7,66	4,46	40,70	38,32	-	7,91	8,62	33,65	570,39	-	3,26	86,51	4,69	-	5,54	1004,13	624,87	1629,00	1,52
LFM634	N	±0,01					±0,15	±0,31	±0,42		±0,46	±0,42	±0,49			±0,06	±1,94	±1,51		±0,37	±85,88	±7,05	±92,93	
		1,40	0,96	0,44	7,26	8,03	3,46	30,79	46,21	4,68	6,02	8,84	31,36	437,48	2,15	4,39	81,63	4,44	-	7,39	960,00	452,44	1412,44	2,03
	U	±0,13					±0,09	±0,56	±0,62	±0,02	±0,18	±0,24	±0,11		±0,07	±0,10	±0,12	±0,00		±0,15	±13,28	±5,04	±8,25	
		2,62	1,94	0,68	7,21	5,99	-	38,67	61,38	-	-	-	26,04	682,25	1,12	5,44	74,94	5,12	8,17	5,21	1457,87	433,20	1891,06	3,18
	A	±0,00						±0,07	±0,07				±0,74		±0,03	±0,16	±0,56	±0,35	±0,27	±0,06	±0,16	±0,00	±0,16	
		2,35	1,68	0,67	7,23	7,87	4,74	37,54	42,03	2,24	6,69	6,76	28,59	671,87	0,31	3,72	93,34	-	-	2,63	1601,42	594,23	2154,69	2,53
RMP1256	N	±0,03					±0,03	±0,09	±0,13	±0,23	±0,12	±0,10	±2,69		±0,03	±0,07	±3,76			±3,72	±79,97	±0,00	±137,88	
		3,59	2,92	0,67	7,26	7,30	3,36	24,15	50,71	3,08	6,86	11,86	18,80	674,92	0,78	7,54	80,42	3,85	0,68	6,75	1737,57	832,21	2569,77	2,00
	U	±0,11					±0,21	±0,06	±1,14	±0,03	±0,37	±0,47	±1,63		±0,00	±0,01	±0,00	±0,04	±0,02	±0,04	±81,78	±0,00	±81,77	
		2,10	1,06	1,04	7,21	6,05	3,38	27,07	48,53	4,75	8,19	8,07	49,50	1039,53	-	3,45	87,23	3,56	0,21	5,54	1480,57	574,28	2054,85	2,49
	A	±0,11					±0,19	±1,46	±1,67	±1,23	±2,19	±0,09	±5,87			±0,06	±0,18	±0,12	±0,29	±0,53	±170,32	±74,56	±95,76	
		1,96	1,12	0,84	7,23	7,34	4,11	29,61	41,67	4,68	10,61	9,32	42,91	841,13	2,13	9,05	75,16	4,65	3,81	5,20	1903,31	617,74	2521,05	2,96
RMP1315	N	±0,04					±0,02	±0,33	±0,52	±0,77	±0,20	±0,29	±1,77		±0,08	±0,25	±1,14	±0,80	±0,15	±0,14	±26,68	±17,13	±43,81	
		1,70	1,21	0,49	7,26	8,14	5,60	33,46	39,49	-	10,60	10,86	28,68	487,63	0,93	7,05	79,16	5,45	-	7,41	454,96	198,79	653,75	2,21
	U	±0,08					±0,15	±0,15	±0,21		±0,03	±0,17	±0,90		±1,32	±0,33	±1,42	±0,55		±0,98	±77,62	±19,15	±58,48	
		1,92	1,20	0,71	7,21	7,09	4,12	35,96	43,22	3,56	2,23	10,91	37,32	714,60	1,31	4,95	83,69	4,23	0,27	5,55	1522,60	433,92	1956,51	3,35
	A	±0,01					±0,04	±0,12	±0,56	±0,25	±0,16	±0,31	±0,67		±0,01	±0,24	±0,69	±0,68	±0,38	±0,14	±4,60	±5,04	±0,44	
		3,64	2,25	1,39	7,23	6,03	1,54	14,93	68,95	4,85	1,82	7,92	38,15	1388,81	-	4,16	84,02	5,15	-	6,66	930,70	401,85	1332,55	2,22
RMP1484	N	±0,28					±0,28	±0,97	±1,79	±0,22	±0,16	±0,16	±1,41			±0,12	±1,38	±1,58		±0,08	±36,38	±54,41	±18,03	
		1,89	1,23	0,66	7,26	8,07	6,04	27,98	43,33	-	12,33	10,32	34,66	655,15	1,52	4,20	80,89	4,69	1,03	7,68	900,09	337,73	1237,82	2,53
	U	±0,01					±0,19	±0,17	0,14		±0,16	±0,05	±0,89		±0,01	±0,07	±0,02	±0,75	±0,02	±0,82	±10,66	±8,06	±18,72	
		5,25	3,18	2,07	7,21	5,96	1,42	13,66	73,37	3,72	1,37	6,45	39,36	2066,24	1,00	5,19	84,67	3,54	0,65	4,95	851,60	279,30	1130,90	2,92
	A	±0,55					0,08	±0,96	±1,48	±0,04	±0,25	±0,23	±1,61		±0,02	±0,20	±1,57	±0,58	±0,49	±0,28	±26,81	±0,00	±26,81	
		1,39	0,93	0,46	7,23	7,60	3,71	38,33	42,61	3,33	2,47	9,56	33,21	461,65	-	4,95	86,45	3,26	-	5,34	1479,57	631,99	2111,56	2,23
RMP1486	N	±0,08					0,05	±0,08	±0,45	±0,25	±0,05	0,13	±3,10			±0,06	±0,06	±0,01		±0,00	±29,36	±31,24	±60,60	
		1,82	1,19	0,63	7,26	7,98	4,74	44,64	36,45	1,64	3,16	9,36	34,68	629,43	0,96	5,30	84,14	4,04	0,51	5,06	998,68	332,74	1331,42	2,87
	U	±0,04					0,23	±0,62	±0,09	±0,05	±0,04	±0,21	±0,66		±0,20	±0,04	±1,50	±0,34	±0,71	±0,70	±44,64	±5,04	39,60	

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia - pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=7,00 - N=7,42 - U=7,15 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – XIV) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de palma (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos									Ramnolipídios									
							Composição PHA (mol%)							PHA	PHA	Composição RHL (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)
		2,15	1,69	0,46	7,18	6,30	-	3,66	27,07	48,49	-	-	20,78	21,22	456,18	0,31	2,92	85,94	3,84	-	6,99	1621,74	904,17	2525,91	1,70
	A	±0,07						±0,08	±0,16	±0,09			±0,16	±2,17		±0,02	±0,04	±0,18	±0,02		±0,10	±6,23	±23,17	±29,41	
		1,57	1,16	0,41	7,19	7,69	-	3,10	27,48	51,16	1,47	1,04	15,75	26,14	411,75	0,37	3,40	86,22	3,46	0,14	6,41	1880,54	805,84	2686,39	2,23
LFM634	N	±0,01						±0,04	±0,16	±0,42	±0,01	±0,01	±0,22	±0,83		±0,01	±0,00	±0,36	±0,10	±0,20	±0,06	±159,02	±123,94	±282,96	
		1,96	1,37	0,59	7,23	8,02	-	5,26	37,01	40,57	0,62	0,56	16,00	29,86	585,34	0,87	4,57	82,21	4,02	0,49	7,84	1026,82	413,97	1440,78	2,37
	U	±0,04						±0,07	±0,96	±0,95	±0,87	±0,79	±0,32	±0,06		±0,18	±0,00	±0,82	±0,17	±0,24	±0,22	±1,97	±35,27	±33,30	
		1,65	0,96	0,69	7,18	5,97	0,98	3,94	30,09	46,33	0,95	1,44	16,28	41,64	687,08	0,81	2,93	81,30	4,46	1,44	9,05	1396,94	832,92	2229,86	1,60
	A	±0,01					±0,01	±0,01	±0,02	±0,13	±0,01	±0,05	±0,11	±0,26		±0,05	±0,35	±5,78	±1,49	1,30	±3,29	±97,32	±95,73	±1,60	
		1,90	1,16	0,73	7,19	7,47	0,52	4,41	34,37	42,96	0,38	1,47	15,89	38,60	731,47	2,65	10,33	72,00	3,32	2,06	9,63	2113,70	647,67	2761,37	3,15
RMP1256	N	±0,04					±0,73	±0,04	±0,43	±0,50	±0,53	±0,00	±0,30	±1,49		±0,12	±0,39	±2,62	±0,84	±0,85	±1,44	±42,23	±63,48	±21,25	
		1,86	1,17	0,68	7,23	7,71	1,16	5,43	38,85	44,95	0,88	1,32	7,41	36,78	682,26	5,28	7,94	62,91	6,86	4,49	12,51	1342,99	337,01	1680,01	3,80
	U	±0,13					±0,06	±0,60	±4,45	±5,13	±0,09	±0,14	±10,48	±4,09		±0,13	±0,75	±1,83	±1,53	±0,11	±2,63	±97,08	±11,08	±86,00	
		1,93	1,38	0,55	7,18	6,18	-	3,85	29,52	49,98	1,48	1,35	13,81	28,56	551,28	0,23	1,89	81,31	6,87	0,66	9,04	1558,61	561,45	2120,06	2,60
	A	±0,14						±0,04	±0,15	±0,20	±0,04	±0,01	±0,34	±0,72		±0,04	±0,07	±2,68	±3,51	±0,93	±0,14	±16,46	±10,08	±26,54	
		2,12	1,38	0,73	7,19	7,23	-	4,58	36,88	41,70	-	1,65	15,18	34,63	732,46	2,39	5,54	74,17	5,73	3,24	8,93	1708,93	519,42	2228,34	3,15
RMP1315	N	±0,12						±0,04	±0,08	0,10		±0,10	±0,08	±1,06		±0,03	±0,02	±0,98	±1,10	±0,17	±0,11	±7,16	±75,57	±82,73	
		1,86	1,10	0,76	7,23	7,93	0,51	4,74	33,82	43,54	1,25	1,52	14,63	40,60	755,07	1,48	4,11	74,98	6,16	2,57	10,69	1345,85	448,17	1794,02	2,83
	U	±0,08					±0,72	±0,06	±0,16	±0,67	±0,07	±0,02	±0,00	±1,51		±0,02	±0,02	±0,57	±0,13	±0,13	±0,54	±11,20	±17,13	±5,93	
		7,28	5,24	2,04	7,18	5,99	-	0,99	8,36	73,05	5,20	1,80	10,61	28,07	2043,33	1,01	8,38	72,39	4,62	1,86	11,74	1603,97	448,88	2052,85	3,39
	A	±0,79						±0,31	±2,31	±10,98	±2,56	±2,55	±3,25	±0,04		±0,06	±0,53	±0,07	±0,29	±0,05	±0,42	±48,15	±14,11	±62,26	
		1,65	1,24	0,41	7,19	7,76	-	3,82	30,42	45,30	1,56	1,88	17,02	24,64	406,52	0,67	5,15	79,36	4,41	0,69	9,72	1531,01	732,45	2263,46	2,00
RMP1484	N	±0,20						±0,09	±0,89	±1,22	±0,48	±1,22	±0,50	±0,51		±0,04	±0,26	±4,03	±1,18	±0,80	±2,35	±17,49	±112,85	±95,36	
		1,81	1,20	0,61	7,23	7,60	-	3,87	28,16	50,19	1,22	0,38	16,19	33,61	608,26	0,97	2,80	85,93	3,73	-	6,57	1841,55	609,19	2450,74	2,87
	U	±0,04						±0,05	±0,19	±0,36	±0,01	±0,54	±0,07	±0,03		±0,01	±0,04	±1,16	±0,52		±0,69	±18,12	±15,11	±33,23	
		1,59	1,15	0,44	7,18	6,22	-	2,88	25,21	53,81	1,82	0,85	15,43	27,71	439,27	-	4,06	79,46	5,59	1,26	9,63	1522,15	590,67	2112,81	2,42
	A	±0,18						±0,06	±0,69	±1,13	±0,04	±0,07	±0,35	±0,18			±0,04	±1,00	±0,08	±0,99	±0,11	±8,23	±9,07	±0,84	
		1,79	1,35	0,44	7,19	7,61	0,69	4,04	32,44	45,30	1,05	1,10	15,38	24,49	438,38	0,90	3,68	81,40	4,95	0,83	8,24	1775,23	716,07	2491,30	2,39
RMP1486	N	±0,01					±0,97	±0,08	±0,44	±0,02	±0,03	±0,40	±0,10	±1,40		±0,01	±0,03	±3,08	±1,12	±1,17	±0,83	±0,31	±132,00	±131,69	
		1,68	1,30	0,38	7,23	8,13	-	5,18	29,48	44,76	1,23	1,46	17,89	22,55	378,85	0,51	5,31	81,39	4,22	-	8,57	1031,86	354,11	1385,98	2,80
	U	±0,06						±0,07	±0,18	±0,37	±0,03	±0,02	±0,13	±0,71		±0,72	±0,35	2,76	±1,18		±1,21	±19,78	±49,37	±29,60	

MSC – Massa seca celular · 3HB - 3-hidroxibutirato · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A= 7,03 - N=7,22 - U= 7,48 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – XV) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de soja (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos									Ramnolipídios										
							Composição PHA (mol%)							PHA	PHA	Composição RHL (mol%)							Concentração (mg/L)			3HA/Ram	E24
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH In.	pH Fin.	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/L)	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)	(%)
		3,46	3,06	0,40	7,25	6,37	0,44	3,77	25,13	52,31	2,07	5,61	10,69	11,69	404,47	-	0,14	2,74	87,69	3,32	-	6,13	883,66	625,58	1509,24	1,34	59,50
	A	±1,05					±0,62	±0,63	±4,07	±6,59	±0,76	±0,40	±1,64	±2,74			±0,19	±0,25	±1,04	±0,28		±0,32	±46,79		±46,79		
		3,19	2,58	0,61	7,29	7,71	-	4,09	26,25	54,88	1,47	4,70	8,63	19,20	612,48	-	0,36	3,54	87,00	3,24	-	5,87	960,22	658,35	1618,57	1,39	63,20
LFM634	N	±1,11						±0,66	±5,08	±1,85	±0,33	±0,83	±1,41	±4,42			±0,00	±0,08	±0,49	±0,06		±0,63	±127,03		±127,03		
		4,97	4,50	0,47	7,31	7,30	-	2,09	17,11	62,17	5,65	-	12,99	9,39	466,68	-	0,25	2,98	86,22	4,13	0,09	6,35	1173,13	770,93	1944,06	1,44	62,20
	U	±0,11						±0,19	±1,29	±4,09	±0,86		±1,74	±1,07			±0,02	±0,07	±0,50	±0,19	±0,12	±0,09	±10,56		±10,56		
		2,73	2,01	0,72	7,25	5,98	-	3,93	29,40	45,78	3,13	10,31	7,46	26,37	719,90	-	1,38	3,04	77,72	7,07	4,63	6,18	832,32	461,70	1294,03	1,70	59,50
	A	±0,26						±0,07	±1,46	±1,85	±0,08	±0,47	±0,05	±5,45			±0,04	±0,09	±3,47	±1,70	±0,82	±1,00	±21,16		±21,16		
		2,13	1,36	0,77	7,29	7,41	-	4,16	32,68	45,44	2,30	8,16	7,28	36,20	771,06	-	1,08	6,71	77,45	5,89	4,63	4,31	1823,01	708,23	2531,24	2,45	62,20
RMP 1256	N	±0,06						±0,08	±0,20	±0,33	±0,01	±0,04	±0,01	±1,29			±0,01	±0,16	±0,74	±0,47	±0,04	±0,42	±92,39		±92,39		
		2,63	2,29	0,34	7,31	7,24	-	3,57	22,70	51,29	3,47	6,58	12,41	13,03	342,69	-	1,24	8,07	82,13	3,10	-	5,47	381,80	1028,86	1410,65	0,36	51,40
	U	±0,06						±0,19	±1,32	±2,06	±0,08	±0,39	±0,24	±0,83			±0,30	±0,16	±0,51	±0,17		±0,23	±25,68		±25,67		
		3,72	2,94	0,78	7,25	5,99	-	3,77	29,73	50,48	1,96	5,77	8,31	20,95	779,34	-	0,47	3,18	86,73	3,54	0,38	5,73	945,98	410,40	1356,38	2,19	59,50
	A	±0,04						±0,26	±1,56	±1,81	±0,19	±0,05	±0,12	±3,56			±0,02	±0,08	±0,04	±0,18	±0,05	±0,18	±22,17		±22,17		
		2,40	1,80	0,60	7,29	7,21	-	4,03	31,60	48,67	1,97	7,31	6,45	25,00	600,00	0,09	1,81	7,12	75,66	5,20	6,13	4,01	2019,69	545,78	2565,46	3,53	59,50
RMP1315	N	±0,03						±0,18	±1,08	±2,23	±0,40	±0,43	±0,13	±1,72		±0,12	±0,04	±0,02	±0,71	±0,28	±0,11	±0,21	±34,30		±34,31		
		4,24	3,68	0,56	7,31	7,35	-	2,68	20,59	58,05	7,54	-	11,16	13,30	563,92	-	0,35	3,11	84,34	4,46	0,37	7,38	1107,37	668,33	1775,69	1,57	48,60
	U	±0,13						±0,13	±1,70	±4,09	±0,93		±1,34	±0,46			±0,08	±0,11	±0,37	±0,08	±0,05	±0,04	±34,68		±34,68		
		4,13	3,44	0,69	7,25	6,26	-	1,79	16,00	70,23	3,00	2,23	6,77	16,73	690,95	-	0,44	4,35	86,96	2,95	-	5,30	473,33	219,45	692,78	2,06	54,10
	A	±0,76						±0,77	±6,24	±9,11	±0,10	±1,00	±1,00	±4,44			±0,03	±0,10	±0,45	±0,13		±0,18	±21,13		±21,12		
		2,71	2,41	0,30	7,29	7,85	-	2,96	23,48	54,66	8,34	-	10,58	11,23	304,33	-	0,43	3,75	84,76	3,88	0,11	7,10	692,89	287,73	980,62	2,29	62,20
RMP1484	N	±0,50						±0,45	±0,77	±2,69	±0,11		±1,57	±0,93			±0,02	±0,25	±0,65	±0,22	±0,15	±0,02	±19,95		±20,13		
		5,06	4,68	0,38	7,31	7,22	-	2,27	19,41	59,94	1,85	2,48	14,07	7,42	375,45	-	0,36	4,44	83,11	4,52	-	7,58	512,01	282,15	794,16	1,72	59,50
	U	±1,56						±0,57	±3,17	±5,64	±0,18	±0,17	±1,53	±1,46			±0,05	±0,02	±0,71	±0,45		±0,23	±48,75		±48,75		
		5,50	4,31	1,19	7,25	6,19	-	1,61	14,95	71,14	2,97	1,84	7,50	21,62	1189,10	-	1,98	11,20	77,56	-	-	9,28	108,46	-	108,46	-	2,70
	A	±1,51						±0,59	±5,47	±7,65	±0,10	±0,58	±0,91	±0,99			±0,16	±1,12	±5,96			±7,25	±10,12		±10,12		
		2,65	2,25	0,40	7,29	7,87	-	2,80	21,83	57,96	8,47	-	8,95	15,20	402,80	-	0,41	3,52	84,48	4,41	0,39	6,81	854,82	339,15	1193,97	2,39	62,20
RMP1486	N	±0,13						±0,23	±2,45	±5,55	±1,28		±1,58	±0,37			±0,03	±0,22	±0,11	±0,18	±0,16	±0,01	±37,12		±37,12		
		4,94	4,60	0,34	7,31	7,27	-	1,68	15,22	62,23	2,72	1,97	16,20	6,97	344,32	-	0,12	3,78	84,31	4,47	-	7,33	651,84	397,58	1049,41	1,55	59,50
	U	±1,67						±0,01	±0,79	±1,17	±0,25	±0,11	±0,74	±0,93			±0,16	±0,17	±0,06	±0,03		±0,04	±39,24		±39,24		

MSC – Massa seca celular · 3HB - 3-hidroxibutirato · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · E24 - Índice de emulsificação · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia · pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A=6,96 - N=7,22 - U=7,52 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final

Anexo A – XVI) Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por isolados bacterianos a partir de óleo de tungue (cerca de 9 g/L).

							Polihidroxialcanoatos										Ramnolipídios									
							Composição PHA Mol%										Composição (mol%)						Concentração (mg/L)			3HA/Ram
Isolados	FN	MSC (g/L)	X_R (g/L)	X_{PHA} (g/L)	pH Inicial	pH Final	3HHx	3HOΔ3	3HO	3HDΔ3,5	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	PHA (%MSC)	PHA (mg/L)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ram	RHL	(mol/mol)
		1,83	1,71	0,12	7,27	6,42	0,82	-	10,60	-	51,22	-	-	37,36	6,35	116,22	-	4,73	87,90	-	2,85	4,52	70,75	45,60	116,35	1,48
	A	±0,03					±1,17		±1,70		±8,44			±8,97	±1,06			±0,60	±9,82		±4,04	±6,39	±8,91	±4,03	±12,94	
		1,14	0,95	0,19	7,28	8,19	3,14	9,94	16,78	8,49	30,39	12,48	5,34	13,43	16,66	189,88	0,30	2,75	79,98	-	8,88	8,09	583,31	275,74	859,05	1,99
LFM634	N	±0,04					±0,11	±0,39	±0,25	±0,34	±0,05	±3,95	±3,36	±1,11	±0,12		±0,42	±0,38	±0,39		±2,22	±1,03	±17,90	±11,08	±28,99	
		1,72	1,54	0,18	7,31	7,83	3,62	10,12	25,68	3,70	33,08	7,16	4,71	11,93	10,30	176,59	-	2,37	79,74	-	8,93	8,95	389,08	232,99	622,07	1,57
	U	±0,11					±0,09	±0,10	±5,16	±5,24	±4,99	±1,83	±3,51	±0,24	±2,54			±0,03	±0,91		±1,47	±0,53	±1,32	±13,10	±11,77	
		2,21	1,64	0,57	7,27	6,33	3,57	9,90	19,92	7,90	29,59	13,35	5,70	10,08	25,69	567,73	0,39	3,04	83,53	-	6,24	6,81	914,17	372,64	1286,81	2,32
	A	±0,01					±0,14	±0,67	±0,81	±0,57	±1,08	±2,43	±0,18	±0,67	±1,83		±0,05	±0,22	±0,46		±0,17	±0,12	±12,08	±11,08	±0,99	
		1,01	0,96	0,05	7,28	7,92	2,94	6,67	15,04	7,13	30,61	7,89	4,83	24,89	5,43	54,79	-	2,20	70,90	-	11,30	15,59	44,63	29,21	73,84	1,41
RMP1256	N	±0,01					±0,16	±0,32	±0,66	±0,29	±1,15	±1,89	±1,38	±1,01	±0,25			±3,12	±1,16		±1,58	±3,54	±4,18	±1,01	±5,18	
		1,23	1,07	0,16	7,31	7,67	3,89	11,91	22,21	7,39	27,05	8,52	5,88	13,15	13,09	161,03	0,35	1,83	79,88	-	7,79	10,16	503,98	270,75	774,73	1,74
	U	±0,00					±0,23	±0,44	±0,16	±0,31	±0,12	±0,82	±0,02	±0,09	±0,75		±0,01	±0,06	±0,96		±0,00	±1,02	±7,78	±0,00	±7,78	
		1,46	1,20	0,25	7,27	6,38	2,21	5,75	13,02	5,02	48,72	6,40	6,94	11,95	17,29	251,55	1,26	5,61	66,06	4,12	11,83	11,12	210,85	96,90	307,75	2,06
	A	±0,02					±0,09	±0,59	±1,36	±0,35	±2,28	±0,30	±0,17	±0,23	±1,90		±0,27	±0,07	±0,25	±0,18	±0,11	±0,15	±10,16	±14,11	±3,94	
		0,90	0,84	0,05	7,28	8,10	3,38	6,91	14,08	6,24	28,61	7,99	6,72	26,06	5,81	52,02	1,68	5,61	72,29	-	4,47	15,95	87,24	33,49	120,73	2,46
RMP1315	N	±0,01					±0,73	±0,04	±0,82	±0,04	±2,30	±0,40	±1,31	±2,05	±0,55		±2,37	±1,12	±0,96		±6,33	±3,79	±2,49	±3,02	±5,51	
		1,23	1,09	0,14	7,31	7,59	3,48	8,70	18,97	8,37	28,70	11,13	6,66	13,99	11,66	143,36	-	2,40	79,30	-	8,82	9,48	212,37	126,83	339,20	1,57
	U	±0,01					±0,15	±0,05	±0,08	±0,10	±0,17	±0,14	±0,14	±0,15	±0,15			±0,09	±0,23		±1,02	±0,87	±10,17	±10,08	0,09	
		1,46	1,42	0,04	7,27	6,57	2,57	5,14	14,12	1,95	39,88	-	5,49	30,85	2,88	42,03	-	-	100,00	-	-	-	10,13	9,98	20,10	1,05
	A	±0,06					±0,52	±0,27	±0,83	±2,75	±4,33		±0,78	±2,41	±0,03				±0,00				±0,39	±4,03	4,42	
		1,73	1,60	0,12	7,28	7,58	3,19	10,13	20,60	4,81	31,53	4,62	5,21	19,91	7,14	123,14	0,43	2,83	79,55	-	7,31	9,88	411,42	126,18	537,61	3,06
RMP1484	N	±0,02					±0,07	±0,31	±0,73	±0,11	±2,08	±0,24	±1,09	±2,45	±0,29		±0,03	±0,26	±0,92		±1,38	±0,23	±29,65	±2,32	±31,97	
		1,61	1,39	0,22	7,31	7,50	3,27	11,37	22,09	5,81	28,82	5,68	5,74	17,22	13,65	219,73	0,47	2,48	81,68	-	6,71	8,66	800,65	284,29	1084,94	2,65
	U	±0,06					±0,10	±0,38	±0,51	±0,22	±1,21	±0,46	±1,10	±1,78	±0,41		±0,04	±0,03	±0,02		±0,01	±0,01	±49,19	±1,01	±48,18	
		0,68	0,66	0,02	7,27	6,66	-	3,03	9,14	-	37,32	-	3,24	47,26	3,49	23,71	-	-	79,09	-	-	20,91	15,25	14,25	29,50	0,96
	A	±0,20						±0,62	±2,01		±8,61		±4,58	±15,82	±0,83				±29,57			±29,57	±8,24	±6,04	±14,28	
		1,95	1,72	0,22	7,28	7,64	3,15	10,68	21,17	3,96	32,69	7,39	4,28	16,67	11,34	220,59	0,34	2,84	81,68	-	6,44	8,69	628,55	250,80	879,35	2,36
RMP1486	N	±0,19					±0,07	±0,44	±0,68	±0,15	±0,91	±0,34	±0,45	±2,14	±0,32		±0,09	±0,11	±2,16		±0,76	±1,20	±31,98	±8,06	±40,04	
		2,04	1,80	0,24	7,31	7,61	3,07	10,92	19,49	5,93	29,55	6,68	7,04	17,31	11,77	240,02	0,26	2,60	85,26	-	3,39	8,49	827,96	321,34	1149,30	2,45
	U	±0,04					±0,27	±1,51	±2,09	±0,66	±0,25	±0,42	±1,47	±3,74	±0,76		±0,02	±0,10	±4,77		±4,80	±0,14	±85,14	±23,17	±61,96	

MSC – Massa seca celular · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxioctanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato · 3HOΔ3 - 3-hidroxi-3-octenoato · 3HDΔ5 - 3-hidroxi-5-decenoato · 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato · 3HDdΔ6 - 3-hidroxi-6-dodecenoato · X_R - Concentração celular residual · X_{PHA} - Porção celular correspondente a polihidroxialcanoatos · Ram - ramnose · 3HA - 3-hidroxiácidos · FN - Fonte de nitrogênio · A - Sulfato de amônio · N - Nitrato de Sódio · U - Ureia pH do meio mineral mais fonte de carbono após 72h: A= 6,94 - N=7,44 - U= 6,97 · pH In. - pH inicial · pH fin. - pH final