RENATA DE MELO PEIXOTO

**Bioprospecção de microrganismos do gênero
Pseudomonas produtores de biossurfactantes**

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

São Paulo

2008

RENATA DE MELO PEIXOTO

**Bioprospecção de microrganismos do gênero
Pseudomonas produtores de biossurfactantes**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

São Paulo

2008

A todos que participaram e acreditaram que neste trabalho!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, por ter acreditado no meu potencial, dedicação e inteligência para realizar este projeto de pesquisa. Suas orientações foram de suma importância para guiar este trabalho e para que sua execução fosse realizada da melhor forma possível.

Agradeço à Profa. Dra. Heloíza Ramos Barbosa pelo acompanhamento, por toda a ajuda prestada e incentivo ao longo deste trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva por toda a colaboração, sugestões e informações que ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

À amiga Bianca Sanchez, muito obrigada pelo incentivo e pelo encorajamento! Sem você, sem a sua ajuda, eu não teria a oportunidade de vir até São Paulo e conhecer este grupo de pesquisa que me acolheu!

Às minhas estagiárias Karem Lopes Almeida e Márcia Ferreira da Silva, pelo esforço de vocês em aprender e me ajudar ao longo deste trabalho. Vocês foram discípulas muito disciplinadas e perseverantes! Espero que o futuro seja tão grande quanto vocês!

Às amigas Paola, Ana Carolina e Érica, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e me ajudando nos momentos mais difíceis deste projeto. Vocês são grandes amigas que quero ter para o resto da vida! Vocês significam muito neste trabalho! Sem a ajuda de vocês, este sonho não teria sido concretizado.

Aos companheiros de laboratório e grandes amigos Sônia, Marco Antônio, Nuri, Daniela, Johana, Sayuri, Thatiane, Rafael, Mateus, Diego e Rogério, muito obrigada por todo o companheirismo, atenção, ajuda nos momentos difíceis, compreensão nos momentos de angústia, amizade e descontração.

Aos amigos do IPT, Roseli, Aelson, Sérgio e César, muito obrigada por todos os bons momentos, por toda a ajuda que vocês me deram nas análises e execução deste trabalho.

À técnica Íris, por toda ajuda, disponibilidade, eficiência e boa vontade que teve comigo durante a execução deste trabalho.

Aos meus pais Domingos Peixoto Neto e Maria Mirtes de Melo Peixoto, por terem acreditado em mim e apoiado meu sonho, pela compreensão e pela força que me deram quando tive que me mudar, sair de casa e enfrentar um mundo novo. Vocês fizeram muita falta nestes últimos dois anos!

Aos meus irmãos que sempre foram espelhos nos quais mirei para seguir seus exemplos de coragem, grandeza e perseverança.

Aos meus avós que me ensinaram a ter coragem, a ser fiel aos meus princípios de honestidade, fidelidade e amor à minha profissão. Vocês são exemplos de vida para mim!

Ao meu namorado Gabriel Boaventura Cunha por todo o amor, atenção, carinho, compreensão, companherismo, cumplicidade, paciência e dedicação que teve por mim durante este trabalho e por toda nossa vida.

Finalmente, gostaria de agradecer à CAPES pelo apoio financeiro dado por 3 meses e à FAPESP pelo apoio financeiro para execução do projeto e pelos 17 meses de auxílio.

RESUMO

Peixoto RM. Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes.[Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Surfactantes de origem química e biológica são substâncias anfipáticas que se localizam em interfaces, diminuem a tensão superficial e formam estruturas agregadas, como as micelas. Este trabalho objetivou isolar microrganismos do gênero *Pseudomonas*, a partir de amostras ambientais de diversos locais; selecionar, dentre os isolados, aqueles que são capazes de produzir biossurfactante e caracterizar os biossurfactantes encontrados de acordo com algumas de suas propriedades. Foram isoladas 1713 linhagens, das quais 944 foram capazes de crescer em meio PIA. Linhagens produtoras de biossurfactantes foram selecionadas utilizando o meio de cultura PPSW, SW+O, SW+L, SW+GP e teste de colapso da gota. Os biossurfactantes produzidos foram caracterizados por CG para avaliação dos ácidos graxos em sua composição. Testes de caracterização foram realizados para avaliar capacidade emulsificante do sobrenadante de culturas de prováveis *Pseudomonas* produtoras de biossurfactante. A análise do sobrenadante para presença de ácidos graxos normalmente encontrados em ramnolipídios demonstrou que em 31 linhagens, das 95 que apresentaram atividades tensoativas, foi detectada a presença de 3-hidroxicanoato (3HD) e que 56 linhagens apresentaram atividades tensoativas após o cultivo, porém não apresentaram picos característicos de ácidos graxos característicos de ramnolipídios. A partir destes resultados, 10 linhagens foram selecionadas para melhor caracterização dos biossurfactantes produzidos por elas. Análises de CG-MS foram feitas para caracterização de picos diferentes que pudessem representar novos compostos. Foi confirmada a produção de ramnolipídios por 3 linhagens e foi possível identificar um novo composto, 3-acetilfurano, que ainda não foi caracterizado por outros autores como provável biossurfactante, tão pouco foi relatado que 2-acetilfurano é produzido por *Pseudomonas*.

Palavras-chave: Bioprospecção; Biossurfactantes; *Pseudomonas*.

ABSTRACT

Peeixoto RM. Bioprospection of biosurfactant producing microorganisms from the genera *Pseudomonas*. [Dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Biological and chemical surfactants are amphipatic compounds which are located at interfaces reducing the superficial tension and form aggregated structures, such as micels. The present work aimed to isolate microorganisms of samples from diverse environments, chosing among the isolated ones, those capable of producing biosurfactants and characterizing it according to some of their properties. From 1713 isolated strains, 944 were capable of growing in PIA medium. Biosurfactant producing strains were selected using the PPSW, SW+GP, SW+L and SW+O culture mediums as well as the drop collapse technique. Biosurfactants produced were characterized by GC to evaluate fatty acids composition. The E24 test was performed to test the emulsifying capability of the supernatant of the probable biosurfactant producing *Pseudomonas*. The supernatant analysis for the presence of fatty acids usually found in rhamnolipids showed that 31 of the 87 strains that presented tensoactive activities, had 3-hydroxyalkanoates (3HD) detected in their supernatant. Other 56 strains had tensoactivity properties detected but their supernatant did not present characteristic rhamnolipid fatty acids peaks. Based in this results 10 isolates were selected for a better characterization of their biosurfactants. Therefore, GC-MS analyses were made to identify if those peaks could represent new compounds. The production of RHLs were confirmed for 3 different strains. It was possible to identify a new compound called 2-acethylfuran that was not mentioned by other authors as a possible biosurfactant or as produced by *Pseudomonas*.

Key words: Bioprospection; Biosurfactants; *Pseudomonas*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura de quatro ramnolipídios diferentes produzidos por <i>P. aeruginosa</i> (Mulligan, 2005).....	26
Figura 2 - Metabólico para representar a biossíntese de RHL (Adaptado de Zhu e Rock, 2008).....	30
Figura 3 - Putisolvina. A e C – Estrutura da Putisolvina I; B – Estrutura da Putisolvina II; D – NRPS responsável pela síntese destas Putisolvinas. (Adaptado de Kuiper et al., 2004 e Dubern et al., 2008).	32
Figura 4 - Isolamento de prováveis linhagens do gênero <i>Pseudomonas</i>	37
Figura 5 - Acima duas placas com 100 vezes mais azul de metileno e abaixo duas placas com a concentração de azul de metileno sugerida por Wild, <i>et al.</i> (1997).....	49
Figura 6 - Concentração de ramnose com o objetivo de definir o tempo de hidrólise.....	51
Figura 7 - Teste de índice de emulsificação realizado em microtubos de centrífuga para observar quais linhagens possíam sobrenadante capaz de formar emulsões.....	57
Figura 8 - Índice de emulsificação observado nas linhagens RMP-1484, RMP-1477, RMP-1469, RMP-1480 e RMP- 1478, respectivamente, quando observados em tubos de vidro com 13mm de diâmetro.	58
Figura 9 - Comparação das composições de 3HA na produção de PHA e RHL de 12 linhagens.....	64
Figura 10 - Cromatograma da linhagem RMP-851, representando o comportamento de picos dos primeiro grupo.....	66
Figura 11 - Cromatograma da linhagem RMP-296B, representando o padrão de picos do segundo grupo.....	66
Figura 12 - cromatograma da linhagem RMP-917, representando o padrão de picos do subgrupo “A”.....	67

Figura 13 - Cromatograma da linhagem RMP-292B, representando o padrão de picos do subgrupo “B”.....	67
Figura 14 - Cromatograma da linhagem RMP-317B2, representando o padrão de picos do subgrupo “C”.....	68
Figura 15 - Cromatograma da linhagem RMP-297, representando o padrão de picos do subgrupo “D”.....	69
Figura 16 - Ensaio de biorremediação com sobrenadantes de isolados contendo prováveis biossurfactantes.	73
Figura 17 - Espectro de massas relativo ao propil-ester do ácido 3-hidroxidecanóico detectado em ramnolipídios produzido pela linhagem RMP1481.....	75
Figura 18 - Espectro de massas relativo ao propil-ester do ácido decanóico detectado em cultivos utilizando óleo de soja como fonte de carbono.....	76
Figura 19 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 7,0 minutos. A. isolado RMP 297 e B. isolado RMP718B.	78
Figura 20 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 9,3 minutos. A. isolado RMP 297 e B. isolado RMP718B.	79
Figura 21 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 10,1 minutos obtido com o isolado RMP810.	80
Figura 22 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 17,2 minutos obtido com o isolado RMP292B.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações industriais de surfactantes químicos e biológicos.....	18
Tabela 2 - Avaliação da formação de halos indicativo da produção de biossurfactante em meio de cultura contendo azul de metileno e CTAB.....	50
Tabela 3 - Locais de coleta, identificação dada às cepas isoladas e porcentagem de prováveis <i>Pseudomonas</i>	53
Tabela 4 - Resultado dos testes de seleção para isolados de lodo de esgoto industrial.....	54
Tabela 5 - Análise geral dos métodos de seleção.	56
Tabela 6 - Produção de ramnolipídios e polihidroxialcanoatos por bactérias isoladas.	61
Tabela 7 - Correlação das linhagens com a porcentagem da área dos picos nos cromatogramas e os testes para verificar propriedades tensoativas.	70
Tabela 8 - Cultivo de <i>Pseudomonas</i> para avaliar a produção de polihidroxialcanoatos e caracterização de biossurfactantes.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3-HA	– 3-hidroxiácidos
3-HD	– 3-hidroxidecanoato
3-HDd	– 3-hidroxidodecanoato
3-HHx	– 3-hidroxihexanoato
3-HO	– 3-hidroxi octanoato
AN	– Ágar Nutriente
CG	– Cromatografia Gasosa
CLP	– Lipopeptídio Cíclico
CN	– Caldo nutriente
CMI	– Concentração Mínima Inibitória
CTAB	– Brometo de Hexadeciltrimetil Amônio
E24	– Índice de emulsificação
E.D.T.A.	– ácido etileno diamino tetracético
HAA	– ácido (3-hidroxiacanolóxi)-alcanóico
HPLC	– cromatografia líquida de alta pressão
MM	– meio mineral
MSC	– massa seca celular
NRPS	– peptídio sintetase não ribossomal
ORF	– <i>open reading frame</i>
PCR	– reação de polimerização em cadeia
PHA	– polihidroxialcanoatos
PHA _{MCL}	– polihidroxialcanoatos de cadeia média
PIA	– <i>Pseudomonas isolation ágar</i>
PPSW	– meio Siegmund-Wagner modificado por Wild, <i>et al.</i> 1997.
RT1	– ramnosiltransferase I
RT2	– ramnosiltransferase II
RHL	– ramnolipídio
rpm	– revoluções por minuto
SDS	– sódio <i>n</i> -dodecil sulfato
SW	– meio Siegmund –Wagner
SW+GP	- meio Siegmund –Wagner + glicose e peptona
SW+L	- meio Siegmund –Wagner + ácido láurico

SW+O – meio Siegmund –Wagner + ácido octanóico

UV – luz ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
1.1 Objetivos.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Bioprospecção e Biotecnologia	20
2.2 Surfactantes	21
2.3 Biossurfactantes.....	22
2.4 <i>Pseudomonas</i>	24
2.5 Produção de Biossurfactantes por <i>Pseudomonas</i>	24
2.6 Aplicações Econômicas.....	27
2.7 Biossíntese de Biossurfactantes	28
2.7.1 Rhamnolipídios.....	28
2.8 Biossíntese de Outros Biossurfactantes	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Meios de Cultura	34
3.2 Caldo e Ágar Nutriente	34
3.3 Ágar Oligotrófico.....	34
3.4 PIA (<i>Pseudomonas</i> Isolation Agar - DIFCO).....	35
3.5 PPSW	35
3.6 Meio Mineral.....	35
3.7 Esterilização	36
3.8 Isolamento de Bactérias	37
3.8.1 Isolamento direto.....	37
3.9 Seleção de Linhagens de Prováveis <i>Pseudomonas</i>	37
3.10 Seleção de Linhagens Produtoras de Biossurfactantes.....	38
3.10.1 Meio PPSW, SW+O, SW+L e SW+GP.....	38
3.10.2 Teste do colapso da gota	38
3.11 Preservação de Linhagens Bacterianas.....	39
3.12 Cultivo de Bactérias sob Condições de Produção de Biossurfactante.....	39

3.12.1 Determinação de pH.....	39
3.12.2 Biomassa (Massa Seca Celular).....	39
3.12.3 Determinação de PHA	40
3.12.4 Caracterização de biossurfactantes	40
3.12.4.1 Índice de emulsificação	40
3.12.4.2 Presença de ácidos graxos.....	41
3.12.4.3 Presença de glicolipídios	41
3.12.4.4 Potencial para a biorremediação.....	42
3.12.4.5 Medidas de tensão superficial.....	42
3.13 Análise da Composição do Biossurfactante.....	44
3.14 Caracterização Molecular das Bactérias Seleccionadas.....	44
3.14.1 Extração de DNA genômico das bactérias seleccionadas.....	44
3.14.2 Amplificação da região 16S rDNA.	44
3.14.3 Análise de DNA em gel de agarose.....	44
3.14.4 Isolamento de DNA a partir de gel de agarose.....	45
3.14.5 Reação de sequenciamento	45
3.14.6 Purificação dos produtos de extensão da reação de sequenciamento.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Padronização de Metodologia.....	47
4.1.1 Avaliação de metodologias para seleção de produtores de biossurfactante.....	47
4.1.1.1 Colapso da gota	47
4.1.1.2 Meio PPSW.....	48
4.1.2 Avaliação da hidrofobicidade da superfície celular.....	50
4.1.3 Métodos de Avaliação do Biossurfactante	50
4.1.3.1 Composição do biossurfactante.....	50
4.1.3.1.1 Presença de carboidratos	51
4.2 Isolamentos.....	52
4.3 Avaliação da Produção de Biossurfactantes.....	53
4.4 Produção.....	56
4.4.1 Isolados que não confirmam a produção de compostos tensoativos.....	56
4.4.2 Isolados produtores de compostos tensoativos.....	57
4.4.2.1 Isolados produtores ramnolipídios.....	59
4.4.2.2 Isolados produtores de compostos tensoativos diferentes de ramnolipídios	65

4.5 Caracterização de biossurfactantes.....	71
5 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	83

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diversidade ecológica, variedade e abundância de espécies em diferentes habitats e comunidades são os temas centrais da ecologia. Hoje, as limitações nas metodologias de estudo e recuperação de microrganismos da natureza subestimam os conhecimentos acerca dos mesmos e de suas comunidades.

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas e da biosfera, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (Schimel, 1995; Myers, 1996). Essa enorme diversidade genética é refletida em uma diversidade metabólica igualmente grande. Além disso, as capacidades metabólicas de alguns procariotos excedem amplamente as atividades que podem ser exercidas por eucariotos, tais como a conservação de energia proveniente de condições anóxicas (na ausência de oxigênio) (Brock, 2005).

Um grupo de substâncias de origem microbiana que tem despertado interesse são os biossurfactantes. Esses compostos são produtos extracelulares ou partes da membrana das células de bactérias, fungos e leveduras com ação surfactante (Mulligan, 2005). São compostos anfipáticos que reduzem a energia livre do sistema por meio da substituição da maioria das moléculas de maior energia situadas nas interfaces. Eles contêm partes hidrofóbicas que não interagem com grande parte do meio aquoso e partes hidrofílicas que interagem com a maior parte do meio (Pietro, *et al.*, 2008)

Os biossurfactantes mais estudados são os ramnolipídios. Esses compostos foram primeiramente isolados de espécies de *Pseudomonas aeruginosa* e descritos por Jarvis e Johnson em 1949. Esses biossurfactantes foram estudados nos mais diferentes aspectos: processo de biossíntese, genética, metabolismo e diferentes aplicações (Sóberon-Chávez, *et al.*, 2005). A literatura relata ainda a síntese de outras substâncias com propriedades tensoativas e emulsificantes produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas* (Coelho, *et al.*, 2003; Hernandez-Anguiano, *et al.*, 2004; Bento, *et al.*, 2005), no entanto, estas não são resultantes de trabalhos de bioprospecção exaustivos.

Quase todos os surfactantes em uso atualmente provêm da indústria petroquímica. Entretanto, com os rápidos avanços na biotecnologia e o aumento das preocupações ambientais entre os consumidores, aliado ao surgimento de novas legislações (Banat, *et al.*, 2000), o interesse em surfactantes de origem microbiana tem crescido recentemente, pois apresentam: grande diversidade química e de propriedades, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior seletividade, atividade sob

condições extremas e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis. Comparado com os surfactantes químicos, eles são bastante seletivos, requeridos em pequenas quantidades, efetivos sob condições de estocagem e de produção de óleos, além de serem ambientalmente aceitos, ao contrário dos surfactantes químicos (Costa, *et al.*, 2006; Desai e Banat, 1997).

Biossurfactantes possuem várias aplicações industriais promissoras (Banat, *et al.*, 2000; Desai e Banat, 1997; Maier e Soberón-Chávez, 2000; Mulligan, 2005, Wattanaphon, *et al.*, 2008). Nas indústrias alimentícias, são potenciais candidatos na busca de diferentes produtos que satisfaçam os pré-requisitos funcionais para serem novos aditivos alimentares (Bloomberg, 1991). Biossurfactantes são, ainda, bastante atrativos para indústrias de cosméticos como umectantes para pele e produtos capilares (Klekner e Kosaric, 1993; Therisod e Klibanov, 1986). São excelentes candidatos para recuperação e remoção em derrames de petróleo, demonstram atividades antifúngicas e bactericidas, sugerindo atividades nos campos da agricultura e medicina. Outras possíveis aplicações estão na indústria têxtil, indústrias de papel, processamento de urânio, na agricultura e na mineração (Desai e Banat, 1997).

Um resumo de algumas aplicações de biossurfactante na indústria é demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Aplicações industriais de surfactantes químicos e biológicos.

Indústria	Aplicação	Papel do surfactante
Petróleo	Melhorar recuperação de óleo	Melhorar a drenagem de óleo da rocha matriz; estimular a liberação do óleo entupido em capilares; umedecimento de superfícies sólidas; redução da viscosidade do óleo e seu ponto de fluidez; diminuição da tensão interfacial; dissolução do óleo.
	Desemulsificação	Desemulsificação de emulsões de óleo; solubilização do óleo; redução de viscosidade; agente umectante.
Ambiental	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos; diminuição da tensão interfacial; seqüestro de metais.
	Remediação do solo	Emulsificação pela aderência de hidrocarbonetos; dispersão; agente espumante; detergente.
Alimentícia	Emulsificação e desemulsificação	Emulsificante; solubilizante; desemulsificante; suspensão; lubrificante; espumante; desespumante; umectante.
	Ingrediente funcional	Interage com lipídios, proteínas e carboidratos; agente protetor.
Biológica	Microbiológica	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular, acesso a nutrientes, competição célula-célula, patogênese de plantas e animais.
	Farmacêutica e terapêutica	Antibacteriano; antifúngico; antiviral; agentes adesivos; moléculas imunomodulatórias; vacinas; terapia gênica.
Agrícola	Biocontrole	Facilitação de mecanismos de biocontrole de micróbios como parasitismo, antibiose, competição, resistência sistemática induzida e hipovirulência.
Bioprocessamento	Processos de recuperação de produtos	Biocatálise em sistemas aquosos bifásicos e microemulsões; biotransformações; recuperação de produtos intracelulares; estímulo de produção de enzimas extracelulares e produtos de fermentação.
	Produtos de Saúde e Beleza	Emulsificantes e agentes espumantes; solubilizantes; agentes umectantes; cremes de limpeza; agentes antimicrobianos; mediadores de ação enzimática.

Fonte: A. Singh, *et al.* / Biotechnology Advances 25 (2007) 99–121.

Recentemente, otimizações de condições de biorreação, a fim de aumentar a eficiência de produção e diminuir o custo do produto final, têm resultado em crescimentos significativos no campo fabricação de biossurfactantes, fazendo-os mais atrativos comercialmente. Outras possíveis reduções de custo na produção de biossurfactantes dependerão largamente do desenvolvimento de processos mais baratos, do uso de matéria prima de baixo custo e do aumento dos padrões de produção por meio de bactérias mutantes hiperativas e geneticamente engenheiradas (Ghurye, *et al.*, 1994).

1.1 Objetivos

Este projeto tem por objetivos:

- Isolar microrganismos do gênero *Pseudomonas*, a partir de amostras ambientais de diversos locais;
- Selecionar, dentre os isolados, aqueles que são capazes de produzir biossurfactante;
- Caracterizar os biossurfactantes encontrados de acordo com algumas de suas propriedades.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioprospecção e Biotecnologia

Segundo definição da Organização das Nações Unidas (UNESCO), bioprospecção é a pesquisa de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos de forma a garantir o uso sustentável, a utilização de estratégias de conservação, a garantia de distribuição justa e equitativa dos benefícios advindos de sua utilização e a promoção e regulamentação de novas tecnologias, uma vez que este material biológico tornou-se um recurso e a informação genética tem valor de mercado (Azevedo, 2003).

As práticas de bioprospecção proliferaram na medida em que companhias farmacêuticas e de biotecnologia em geral se engajaram em coletar e selecionar recursos biológicos e genéticos por todo o mundo (Dedeurwaerdere, 2004)

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. É considerada uma tecnologia robusta, confiável e de baixo risco, capaz de ser implementada em grande escala por uma ampla gama de setores industriais. Também é considerada uma das tecnologias-chave para o desenvolvimento no século XXI, pois apresenta um forte impacto nos principais problemas globais (doenças, desnutrição, poluição ambiental) e apresenta uma forma de atingir processos industriais sustentáveis (uso de recursos renováveis, processos e produtos limpos, melhora de problemas como o aquecimento global) (Bull, *et al.*, 2000).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (Myers, 1996; Schimel, 1995). Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (Staley, 1998).

A grande maioria dos esforços de estudo e uso sustentável da biodiversidade tem sido enfocada em macrorganismos (mamíferos, aves, peixes e plantas). Estimativas recentes indicam que os microrganismos e invertebrados constituem quase 90% das espécies da biosfera e desempenham um papel fundamental no funcionamento de ecossistemas. Conhecemos mais de 80% das plantas e mais de 90% dos vertebrados existentes na natureza, enquanto que conhecemos menos de 1% das bactérias e vírus, e menos que 5% dos fungos (Hamond, 1995).

O número de espécies de bactérias descrito na literatura vem crescendo nos últimos anos em virtude do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular que possibilitam a análise de seqüências de DNA a partir de material genômico extraído diretamente de amostras ambientais. As novas técnicas evidenciaram a enorme diversidade genética de bactérias presentes em pequenas quantidades de solo. Estima-se que, em 1g de solo, ocorram entre 20 e 40 mil espécies bacterianas. Considerando-se que são descritas cerca de 5.000 espécies de bactérias, cuja maioria não é de solos, há uma enorme lacuna de conhecimento a ser preenchida em estudos de biodiversidade (Canhos e Manfio, 2002).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos (Colwell, 1997; Hunter-Cevera, 1998). Entre eles, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como, por exemplo, as plantas e animais. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para: novos antibióticos e agentes terapêuticos; probióticos; produtos químicos; enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas; biorremediação de poluentes; e biolixiviação e recuperação de minérios. Outros benefícios incluem o prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas, e a otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos e despoluição das águas (Canhos e Manfio, 2002).

2.2 Surfactantes

Surfactantes possuem porções estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, o que, em partes, lhes fornece propriedades incomuns, incluindo: a habilidade de diminuir a tensão superficial da água, aumentar a solubilidade, poder detergente, capacidade de formar emulsões e habilidades dispersantes. Surfactantes se concentram nas interfaces (sólido-líquido, líquido-líquido, ar-líquido). Uma barreira interfacial existe entre duas fases imiscíveis. A porção hidrofóbica se direciona para a superfície, enquanto a porção hidrofílica se direciona para a solução (Mulligan, 2005). Surfactantes sintéticos estão disponíveis em várias formas e geralmente são classificados de acordo com sua carga atômica como: aniônico, catiônicos e anfotéricos (Swisher, 1987; Ash e Ash, 1993; Schmitt, 2001). Exemplos bastante familiares de surfactantes químicos utilizados nos laboratórios de biologia incluem o sódio *n*-dodecil

sulfato (SDS) que é um alquil sulfato aniônico e o Triton X-100 que é um álcool etoxilado não iônico (VanHamme, *et al.*, 2006).

Surfactantes sintéticos são comumente produzidos utilizando-se de uma variedade de métodos químicos orgânicos, dependendo do tipo e da estrutura da molécula desejada (Desai e Desai, 1993).

A importância comercial dos surfactantes é evidente, devido à crescente produção e à variedade de aplicações industriais destes compostos. Industrialmente, os surfactantes têm sido utilizados como espessantes, floculantes, agentes dispersantes e emulsificantes, desemulsificantes e penetrantes (Mulligan e Gibbs, 1993). Aproximadamente 54% dos surfactantes produzidos são utilizados como detergentes domésticos e para lavanderia, sendo que somente 32% dos surfactantes são destinados às indústrias. A maior parte dos surfactantes comercialmente disponíveis é originada de processos químicos, em sua maioria, derivados de petróleo (Banat, *et al.*, 2000).

Os surfactantes sintetizados quimicamente são bastante empregados na indústria petrolífera auxiliando a limpeza de derrames de petróleos e limpeza dos reservatórios (Chakrabarty, 1985).

2.3 Biosurfactantes

Os biosurfactantes constituem um grupo bastante diverso de compostos tensoativos sintetizados por microrganismos (Nitschke, *et al.*, 2005). São metabólitos bacterianos que possuem a típica estrutura anfifílica dos surfactantes sintéticos em que a porção hidrofóbica é constituída ou de ácidos graxos de cadeias longas, ou hidroxiácidos, ou ainda α -alquil- β -hidroxi ácidos graxos. A porção hidrofílica pode ser constituída ou de carboidratos, ou de aminoácidos, ou de um peptídeo cíclico, ou de um fosfato, ou de um ácido carboxílico, ou de um álcool (Desai e Desai, 1993).

Bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir esses compostos que podem ser classificados em glicolipídios, lipoaminoácidos, lipopeptídeos, lipoproteínas, lipopolissacarídeos, fosfolipídeos, monoglicerídeos e diglicerídeos, compostos poliméricos e particulados (Mulligan, 2005; Maier e Soberón-Chávez, 2000; Biermann, *et al.*, 1987).

Os microrganismos sintetizam uma grande variedade de biosurfactantes de massas moleculares alta e baixa (Banat, 1995; Lin, 1996; Desai e Banat, 1997; Cameotra e Makkar, 1998; Rosenberg e Ron, 1999). Exemplos de biosurfactantes de baixo peso molecular são os ácidos graxos, glicolipídios, lipopeptídios cíclicos e lipopeptídios. Os biosurfactantes de alto

peso molecular são os polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (Rosenberg e Ron, 1990). A maioria dos compostos ou são aniônicos ou neutros. Apenas poucos são catiônicos, como aqueles que possuem grupamento amina (Mulligan, 2005).

Surfactantes de origem química e biológica são substâncias anfipáticas que se localizam em interfaces, diminuem a tensão superficial e formam estruturas agregadas, tais como as micelas. Devido a essas propriedades, os surfactantes alteram o comportamento da interface e de moléculas que se encontram nela e em solução. A vida microbiana pode ser mais comum nas interfaces, como pode ser evidenciado nos biofilmes microbianos, nos filmes de superfície e nos agregados. Dado que toda a vida microbiana é impactada pelo fenômeno interfacial – o envelope celular sendo a interface mais óbvia com a qual os microrganismos interagem com seu ambiente – biossurfactantes seriam um mecanismo comum pelo qual os microrganismos lidam com desafios interfaciais. Por exemplo, o controle interfacial de transportes de nutrientes, excretas, moléculas sinalizadoras e, ainda, é onde ocorre a interação micróbio-hospedeiro em processos de patogênese (Van Hamme, *et al.*, 2006).

Biossurfactantes influenciam de forma dramática na fisiologia microbiana em áreas como a mobilidade celular, comunicação celular, acesso aos nutrientes, competição célula-célula e na patogênese em plantas e animais (revisado por: Ishigami e Suzuki, 1997; Peypoux, *et al.*, 1999; Lang, 2002; Cameotra e Makkar, 2004, Van Hamme, *et al.*, 2006). Atualmente, está claro que os biossurfactantes influenciam em muitas funções celulares, bioquímicas e fisiológicas.

Quase todos os surfactantes em uso atualmente provêm da indústria petroquímica. Entretanto, com os rápidos avanços na biotecnologia e o aumento das preocupações ambientais entre os consumidores, aliado ao surgimento de novas legislações (Banat, *et al.*, 2000), o interesse em surfactantes de origem microbiana tem crescido. Algumas vantagens que apresentam são: grande diversidade química e de propriedades, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior seletividade, atividade sob condições extremas e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (Costa, *et al.*, 2006; Desai e Banat, 1997).

A compreensão de biossurfactantes como uma classe de moléculas permanece limitada. Isso se dá, parcialmente, porque os estudos que envolvem esses compostos são desenvolvidos a cerca de um pequeno número de biossurfactantes já bem caracterizados.

Aliado a isso, está a falta de esforços concentrados em bioprospecção de novos biossurfactantes e dos microrganismos produtores desses (Bodour, *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de metodologias de seleção que sejam rápidas e confiáveis, aliadas à seleção de microrganismos, dos milhares de organismos potencialmente ativos, e a subsequente avaliação da atividade superficial são a chave para o descobrimento de novos biossurfactantes (Chen, *et al.*, 2007).

2.4 *Pseudomonas*

Pseudomonas é o gênero incluído nas γ -proteobactérias pertencentes à família das *Pseudomonadaceae*. São bastonetes Gram-negativos que podem ser móveis por flagelos polares ou imóveis. Recentes análises de seqüências de RNAr 16S redefiniram a taxonomia de muitas espécies bacterianas. Um resultado disso é a inclusão no gênero *Pseudomonas* dos gêneros formalmente classificados como *Chryseomonas* e *Flavimonas* (Anzai, *et al.*, 2000). Outras linhagens previamente classificadas no gênero *Pseudomonas* agora são classificadas nos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (Azai, *et al.*, 1997).

Diversas espécies de *Pseudomonas* podem ser isoladas de diferentes habitats (água, solo, plantas) e, devido a sua ampla distribuição no ambiente e facilidade de cultivo, esse gênero constitui-se em um dos grupos bacterianos melhor estudados (Aagot, *et al.*, 2001). Os papéis desempenhados por *Pseudomonas* no ambiente incluem a biodegradação de compostos naturais e xenobióticos (Galli, *et al.*, 1996), promotores de crescimento de plantas (O'Sullivan e O'Gara, 1992) e patógenos de plantas (Schroth, *et al.*, 1991). *Pseudomonas* é ainda um gênero de grande importância em processos industriais envolvendo biotransformações (Wubbolts e Witholt, 1998). No gênero *Pseudomonas* encontramos, ainda, *P. aeruginosa*, que é um patógeno humano oportunista que pode causar sérias infecções (Pelczar, *et al.*, 1993).

No ano 2000, a seqüência completa do genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 foi determinada. Recentemente, as seqüências de outras espécies foram determinadas, incluindo, *P. putida* KT2440 (2002), *P. fluorescens* Pf-5 (2005), *P. syringae* patovar tomate DC3000 (2003), *P. syringae* patovar syringae B728a (2005), *P. syringae* patovar phaseolica 1448A (2005), *P. fluorescens* PfO-1 and *P. entomophila* L48 (Cornelis, 2008) .

2.5 Produção de Biossurfactantes por *Pseudomonas*

Os biossurfactantes mais estudados são os ramnolipídios (Sóberon-Chávez, *et al.*, 2005). Os ramnolipídios foram descritos, pela primeira vez, por Bergström, *et al.* (1946).

Jarvis e Johnson, em 1949, descreveram o composto e, em 1963, foi proposta, pela primeira vez, uma via biossintética para síntese de ramnolipídios (Cha, *et al.*, 2007). Segundo Ochsner & Raiser (1995), os principais ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* são o ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (monorramnolipídio) e o ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (dirramnolipídio).

Os primeiros genes associados à biossíntese de ramnolipídios foram caracterizados nos anos 90 (Ochsner, *et al.*, 1994a; Ochsner, *et al.*, 1994b; Ochsner e Reiser, 1995). Entretanto, o quadro completo foi obtido apenas recentemente (Rahim, *et al.*, 2001; Déziel, *et al.*, 2003; Olvera, *et al.*, 1999; Campos-Garcia, *et al.*, 1998).

Os ramnolipídios podem ser comercialmente produzidos em concentrações acima de 100 g/L (Giane, *et al.*, 1997) e, nessa proporção, os biossurfactantes começam a competir com o custo dos surfactantes sintéticos (Lang e Wullbrandt, 1999). Os ramnolipídios têm sido estudados para muitas aplicações em diversas áreas; por exemplo, na descontaminação de áreas impactadas com óleo, na remoção de metais tóxicos do solo, na recuperação de petróleo, na produção de cosméticos e na indústria farmacêutica, processos de biorremediação, na proteção agrícola, na biodegradação de hidrocarbonetos e controle biológico de patógenos de plantas. Ramnolipídios são também fontes potenciais de L-ramnose e 3-hidroxiácidos e há um grande interesse nesse aspecto devido às aplicações industriais do produto. L-ramnose, por exemplo, é utilizada como precursor na produção de aromas (Strelec, 2006).

A produção de ramnolipídios também tem sido relatada para outras espécies de *Pseudomonas* diferentes de *P. aeruginosa* (Sundari e Sandhya, 1995; Amezcua-Vega, *et al.*, 2004; Gunther, *et al.*, 2005; Martinez-Toledo, *et al.*, 2006).

No que tange às novidades e variedades encontradas em uma única espécie, Benicasa, *et al.* (2004) descreveu seis homólogos de ramnolipídios produzidos por uma *Pseudomonas* sp. quando cultivada em rejeitos de produtos resultantes da manufatura de óleos vegetais, enquanto que Haba, *et al.* (2003) descreveu onze homólogos de ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* quando cultivada em óleos vegetais usados em frituras.

Figura 1 - Estrutura de quatro ramnolipídios diferentes produzidos por *P. aeruginosa* (Mulligan, 2005).

Outros biossurfactantes diferentes dos ramnolipídios têm sido detectados em bactérias do gênero *Pseudomonas*, tais como: Artrofactina (Roongsawang, *et al.*, 2003; Balibar, *et al.*, 2005; Lim, *et al.*, 2007); Biosur PM (Phale, *et al.*, 1995); Corrugatina (Risse, *et al.*, 1998); Lipopeptídios cíclicos (Nielsen, *et al.*, 2005); Lipodepsipeptídios (Monti, *et al.*, 2001); Particulados (Burd e Ward, 1997); Pseudomicina A (Coiro, *et al.*, 1998); Putisolvina I e II (Kuiper, *et al.*, 2004), Pultisolvina (Dubern, *et al.*, 2005); Polipeptina (Ui, *et al.*, 1997); Siringomicina e Siringopeptina (Carpaneto, *et al.*, 2002); Viscosina (Braun, *et al.*, 2001; Saini, *et al.*, 2008), ácido 7,10-dihidroxi-8-octadecenóico (Deandres, *et al.*, 1994).

Muitos trabalhos, entretanto, relatam a detecção de substâncias com propriedades tensoativas ou emulsificantes provenientes de bactérias do gênero *Pseudomonas* sem chegar a uma caracterização definitiva (Coelho, *et al.*, 2003; Hernandez-Anguiano, *et al.*, 2004; Bento, *et al.*, 2005).

Novas descobertas de biossurfactantes têm sido dedicadas ao emprego de múltiplas metodologias analíticas e esforços significativos na seleção de produtores. Sem dúvida, a

diversidade de microrganismos também nos sugere que somente uma pequena porção dos biossurfactantes foi descoberta e caracterizada (VanHamme, *et al.*, 2006).

2.6 Aplicações Econômicas

A participação de produtos oriundos de microrganismos no mercado global está entre US\$ 500 bilhões e US\$ 100 bilhões por ano. Entretanto, pode-se afirmar que essa exploração da diversidade microbiana ainda é muito incipiente (MCT, 2002).

Um estudo da McKinsey apresentado na Bio-Conferência em Nova Iorque (2003) aponta que a porção do mercado voltada para a indústria da biotecnologia irá aumentar de forma dramática em todas as áreas e, particularmente no ramo da química fina, até o ano de 2010. A velocidade desse crescimento dependerá de fatores como os preços do petróleo e de produtos agriculturáveis, desenvolvimento tecnológico e vontade política para ajudar a estruturar essas novas tecnologias (Soetaert e Vandamme, 2006).

Durante as últimas décadas, o interesse por surfactantes de origem biológica tem crescido, o que acarretou no aumento das pesquisas interessadas em produzir biossurfactantes que possuam um custo compatível, quando comparado ao surfactante derivado de produtos petroquímicos (Heyd, *et al.*, 2008).

A vantagem mais importante dos biossurfactantes, quando comparados aos sintéticos, é que são ecologicamente mais aceitos, devido à sua baixa toxicidade e biodegradabilidade na natureza (Deleu, *et al.*, 2004).

Até o ano de 2010, os biossurfactantes podem deter cerca de 10% do mercado de surfactantes sintéticos, chegando à marca de US\$ 200 milhões em vendas. As aplicações mais promissoras estão relacionadas às preocupações ambientais, tais como a biorremediação de hidrocarbonetos, poluentes orgânicos e de locais contaminados com metais pesados; também com o tratamento de derrames de óleos e com o aumento da recuperação de petróleo nas prospecções (Hester, 2001; O'Connor, 2002).

Biossurfactantes podem ser tão eficientes quanto os surfactantes químicos e, para certas aplicações, eles podem ter inúmeras vantagens, justamente por apresentarem grande diversidade química e de propriedades, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior seletividade, atividade sob condições extremas e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (Singh, *et al.*, 2007; Desai e Banat, 1997).

A literatura tem citado efeitos antibióticos e inibidores de crescimento do vírus da imunodeficiência humana por ação de certos surfactantes. A deficiência de surfactantes

pulmonares é responsável pela falência respiratória em bebês prematuros. O isolamento de genes que codificam as moléculas das proteínas que compõem esse surfactante, clonando-os em bactérias, tornou possível a produção fermentativa do mesmo para aplicações médicas (Kitamoto, *et al.*, 1993; Lang e Wagner, 1989; Neu, *et al.*, 1990).

Outras possíveis aplicações estão na indústria têxtil, indústrias de papel, processamento de urânio, na agricultura e na mineração (Desai e Banat, 1997).

2.7 Biossíntese de Biosurfactantes

A seguir, são descritos aspectos metabólicos e genéticos da biossíntese de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas*.

2.7.1 Ramnolipídios

Estudos bioquímicos nos anos 60 demonstraram que a biossíntese de ramnolipídios envolve a transferência sequencial de dois grupos glicosil a partir de TDP-ramnose para o β -hidróxialcanoil- β -hidróxialcanoato, levando à formação de mono e diramnolipídio, respectivamente. A transferência dos grupos ramnosil é catalisada por duas ramnosiltransferases denominadas RT1 e RT2 (Burger, *et al.*, 1963; Burger, *et al.*, 1966).

Pesquisas e estudos genéticos visando a melhor compreensão da síntese de ramnolipídios começaram nos anos 90. Foram obtidas *Pseudomonas aeruginosa* mutantes por transposon, incapazes de crescer em meios contendo hidrocarboneto como única fonte de carbono e não produtoras de ramnolipídios (Koch, *et al.*, 1991). Foi identificado um clone capaz de restaurar a síntese de ramnolipídios no mutante utilizando-se uma biblioteca genômica de cosmídios. Subclonagens e sequenciamento desse fragmento de DNA revelaram uma ORF denominada *rhlR*, cujo produto (RhlR) apresentou similaridade com ativadores transcricionais do tipo LasR e LuxR, em *P. aeruginosa* e *Vibrio fischeri*, respectivamente (Ochsner, *et al.*, 1994a), que estão envolvidos nos sistemas regulatórios de *quorum sensing* em bactérias (Lazdunski, 2004). Uma interrupção no gene *rhlR* permitiu a obtenção de mutantes incapazes de produzir ramnolipídios.

O gene *rhlI* foi identificado imediatamente após o gene *rhlR* e, provavelmente, é o responsável pela síntese do auto-indutor que ativa RhlR (Ochsner, *et al.*, 1995).

A avaliação de outros mutantes de *P. aeruginosa* por transposon, incapazes de produzir ramnolipídios e não apresentando atividade de ramnosiltransferase permitiu a identificação dos genes *rhlAB*. A transcrição de tais genes é ativada por RhlR. A expressão

dos genes *rhlAB* em cepas recombinantes de *E. coli* levou à produção de ramnosiltransferases ativas (Ochsner, *et al.*, 1994b). Porém, não foi observada nenhuma síntese de ramnolipídio (Ochsner, *et al.*, 1995b). Foi claramente demonstrado que o produto do gene *rhlB* corresponde a ramnosiltransferase I (RT1), enquanto RhlA possuía um papel importante na produção de ramnolipídios, não definido claramente naquele momento (Ochsner, *et al.*, 1994b).

Rahim e colaboradores (2001) localizaram um segundo gene que, potencialmente, codificaria para ramnosiltransferases em *P. aeruginosa* denominado *rhlC*. Um mutante de *P. aeruginosa* com o gene inativado não produz di-ramnolipídio, mas é capaz de produzir mono-ramnolipídio. Assim, RhlC corresponde à ramnosiltransferase II (RT2), que catalisa a transferência de um grupo ramnosil para um monoramnolipídio formando o diramnolipídio.

Um aspecto importante na síntese de ramnolipídios é o mecanismo pelo qual intermediários do metabolismo de ácidos graxos são transferidos para a biossíntese de ramnolipídios, bem como os 3-hidróxiácidos são ligados entre si para formar o ácido 3-(3-hidroxi-*alcanoloxi*)-*alcanóico* (HAAs).

Campos-García, *et al.* (1998) propuseram que o produto do gene *rhlG* estaria envolvido na conversão de 3-cetodecanoil-ACP em 3-hidróxidecanoil-ACP, que seria utilizado na biossíntese de RHL. A importância do papel de RhlG na biossíntese de RHL foi confirmada por Rehm, *et al.* (2001). Entretanto, com base em estudos bioquímicos e estruturais, Miller, *et al.* (2006) sugerem que RhlG não representa o ponto de saída da biossíntese de ácidos graxos para a biossíntese de RHL.

Algumas evidências apresentadas por Déziel e colaboradores (2003) indicam que *rhlA* é requerido para a síntese de ácido 3-(3-hidroxi-*alcanoloxi*)-*alcanóico* (HAA), que é o substrato para a RT1 (RhlB) e leva à formação de mono-ramnolipídio. Zhu e Rock (2008) avaliaram o papel de RhlA e demonstraram que essa enzima catalisa a condensação de duas moléculas de β -hidróxi-*alcanoil*-ACP para a formação do HAA. Ainda segundo esses autores, RhlG não teria qualquer papel na biossíntese de ramnolipídios e apresentaram um modelo metabólico para representar a biossíntese de RHL (Figura 2). Dessa forma, o papel do RhlG permanece controverso e ainda precisa ser esclarecido.

Figura 2 - Metabólico para representar a biossíntese de RHL (Adaptado de Zhu e Rock, 2008).

Outro aspecto interessante na biossíntese de ramnolipídios é sua relação com a biossíntese de Polihidróxialcanoatos (PHAs). PHAs produzidos por linhagens de *Pseudomonas* são poliésteres formados a partir de 3-hidróxoalcanoatos contendo de 6 a 14 átomos de carbono. A partir de carboidratos, o PHA produzido consiste, principalmente, de 3-hidróxidecanoato, que representa também o principal 3-hidróxiácido em ramnolipídios. Uma vez que RHL e PHA podem ser produzidos simultaneamente (Chayabutra, *et al.*, 2000; Hori e Unno, 2002, Strelec, 2006; Marsudi, *et al.*, 2008), as rotas de biossíntese devem competir por intermediários do metabolismo de ácidos graxos. De acordo com o que foi proposto por Zhu e Rock (2008) (Figura 2), RhIA e PhaG seriam responsáveis pela transferência de intermediários da biossíntese de ácidos graxos para a biossíntese de RHL e PHA, respectivamente.

2.8 Biossíntese de Outros Biossurfactantes

Alguns dos biossurfactantes produzidos por diferentes espécies de *Pseudomonas* não foram estudados com relação às suas rotas de biossíntese, tais como: Biossurfactantes Particulados (Burd e Ward, 1997); ácido 7,10-Diidróxi-8(E)-octadecenóico (Andrés, 1994) e BiosurPM (Phale, *et al.*, 1995).

Um grupo importante de biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* são os lipopeptídios cíclicos (também descritos na literatura como: lipodepsipeptídios) (CLPs). Nesta categoria, estão incluídos: Artrofactina (Roongsawang, *et al.*, 2003; Balibar, *et al.*, 2005); Folipeptina (Ui, *et al.*, 1997); Pseudomicinas (Harrison, *et al.*, 1991; Ballio, *et al.*, 1994; Coiro, *et al.*, 1998); Siringomicina (Serge, *et al.*, 1990; Fukuchi, *et al.*, 1990a); Siringotoxinas (Ballio, *et al.*, 1990; Fukuchi, *et al.*, 1990b); Siringostatinas (Isogai, *et al.*, 1990); Siringopeptina 25A (Carpaneto, *et al.*, 2002); Tensinas (Hariksen, *et al.*, 1999; Nielsen, *et al.*, 2000); Afisinas (Sorensen, *et al.*, 2001; Nielsen, *et al.*, 2005); Putisolvinas (Dubern, *et al.*, 2005; Kuiper, *et al.*, 2004; Dubern, *et al.*, 2008); Viscosina (Braun, *et al.*, 2001).

Lipopeptídios cíclicos são compostos por uma calda de ácidos graxos ligada a um pequeno oligopeptídio, que por sua vez é ciclizado para formar um anel de lactona entre dois aminoácidos e a cadeia peptídica. CLPs são bastante diversos em termos de estrutura e atividade biológica. A diversidade estrutural se dá devido a diferenças no comprimento e composição da calda de ácidos graxos e devido às variações no número, tipo e configurações dos aminoácidos em sua parte peptídica (Raaijmakers, *et al.*, 2006). Os lipopeptídios cíclicos são produzidos por várias espécies de *Pseudomonas* associadas a plantas, incluindo as *P. syringae*, *P. tolaasii*, *P. fuscovaginae*, *P. corrugata* e *P. fluorescens* patogênicas para plantas (Bander, *et al.*, 1990), e por múltiplas linhagens classificadas como antagonistas, tais como *P. florescens* e *P. putida* (Nielsen, *et al.*, 2002; Nybroe e Sorensen, 2004).

A biossíntese desses compostos é feita por uma peptídio sintetase grande e multifuncional, não ribossomal (NRPS), que possui uma estrutura modular, em que cada módulo é um bloco construtor que resulta em incorporações e modificações, passo a passo, em cada unidade de aminoácidos (Gewolb, 2002; Seiber e Marahiel, 2005). Um módulo típico de NRPS consiste em um domínio de adenilação (A), responsável pela ativação do aminoácido, um domínio de tilação (T, ou alternativamente PCP), responsável pela tioesterificação do aminoácido ativado; e um domínio de condensação (C) que é responsável pela ligação peptídica entre dois substratos vizinhos para elongação da cadeia peptídica. Esses domínios catalíticos geram um peptídio linear que é clivado ao final por um domínio

tioesterásico (TE), resultando na liberação de um produto linear ou cíclico via uma reação de ciclização intramolecular (Raaijmakers, *et al.*, 2006). Domínios adicionais em NRPSs podem incluir um domínio de epimerização (E), responsável pela conversão de uma configuração L ou D para um aminoácido (Peypoux, *et al.*, 1990; Sieber e Marahiel, 2005). Um exemplo da estrutura de um lipopeptídio cíclico (Putisolvina I e II) e a peptídio sintetase não ribossomal que os sintetiza é ilustrada na Figura 3.

Figura 3 - Putisolvina. A e C – Estrutura da Putisolvina I; B – Estrutura da Putisolvina II; D – NRPS responsável pela síntese destas Putisolvinas. (Adaptado de Kuiper *et al.*, 2004 e Dubern *et al.*, 2008).

Dois dos modelos de vias biossintéticas de CLP melhor caracterizados são os grupos de sintetases para Artrofactinas (Roongsawang, *et al.*, 2003) e para Siringomicinas (Bender, *et al.*, 1999; Guezzi, *et al.*, 1998a).

É possível observar que um grande número de genes reguladores da biossíntese de lipopeptídios cíclicos já foi descoberto e grande parte dos modelos de biossíntese da porção peptídica dessas moléculas já foi ou está sendo estudada. Porém, pouca atenção foi dada, até o momento, para a biossíntese da porção de ácidos graxos da molécula. Uma vez que diferentes lipopeptídios cíclicos apresentam o ácido 3-hidróxidecanóico como componente lipídico

(Raaijmakers, *et al.*, 2006), é de se suspeitar a existência de uma relação metabólica na síntese desses compostos e de PHAs e/ou ramnolipídios.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de Cultura

Neste estudo, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Ágar Nutriente; Ágar Oligotrófico (Aagot, *et al.*, 2001); PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar - DIFCO); PPSW (Wild, *et al.*, 1997); Caldo Nutriente (Meio Complexo) e Meio Mineral (Meio sintético) (Ramsay, *et al.*, 1990).

3.2 Caldo e Ágar Nutriente

Extrato de carne..... 3,0 g/L

Peptona bacteriológica..... 5,0 g/L

Para obtenção do ágar nutriente, foram adicionados 15-20 g/L de ágar.

3.3 Ágar Oligotrófico

Foram utilizados 900 mL de solução Salina de Winogradsky com a seguinte composição:

K₂HPO₄..... 0,4 g/L

MgSO₄.7H₂O..... 0,13 g/L

NaCl..... 0,13 g/L

MnSO₄.H₂O..... 1,52 mg/L

NH₄NO₃..... 0,5 g/L

Extrato de Solo: Para o preparo deste extrato, o solo coletado foi seco a 30 °C e passado por uma peneira de diâmetro 2 mm. Ao solo peneirado, foi adicionada água MilliQ na proporção 1:1 (m/v) e as partículas foram removidas por sedimentação por 2 horas, seguida de centrifugação (5000 *xg*, 20 °C, 20min). O sobrenadante foi filtrado em filtro estéril com porosidade 0,2 µm. Quando a amostra coletada era lodo de esgoto, ela somente era centrifugada (5000 *xg*, 20 °C, 20min) e, o sobrenadante, filtrado em filtro estéril com porosidade 0,2 µm (Millipore).

Composição do meio Ágar Oligotrófico

Solução Salina de Winogradsky..... 900 mL

N-lauroyl sarcosina sódio (Sigma, St. Louis, Mo)..... 1,2 g

CSE (Extrato de Solo).....	100 mL
Trimethopim (Sigma).....	20 mg
Nistatina (Sigma).....	50 mg
Casamino Ácidos (Sigma).....	5 g
Ágar-Ágar.....	20 g/L

3.4 PIA (Pseudomonas Isolation Agar - DIFCO)

Peptona bacteriológica.....	20,0 g/L
Cloreto de Magnésio.....	1,4 g/L
Sulfato de Potássio.....	10,0 g/L
Irgasan (Ciba-Geigy).....	0,025 g/L
Ágar-Ágar.....	13,6 g/L
pH.....	7,0 +/- 0,2

3.5 PPSW

NH ₄ Cl ₂	0,02 M
KCl.....	0,02 M
Tris-HCl.....	0,12 M
MgSO ₄	0,0016 M
Glicose.....	0,5%
Peptona.....	1,0%
CTAB.....	200 µg/mL
Azul de Metileno.....	2,5 µg/L
Ágar-Ágar.....	20 g/L
pH final.....	7,2

3.6 SW

NH ₄ Cl ₂	0,02 M
KCl.....	0,02 M
Tris-HCl.....	0,12 M
MgSO ₄	0,0016 M
CTAB.....	200 µg/mL
Azul de Metileno.....	2,5 mg/L

Fonte de carbono	1 g/L
Ágar-Ágar.....	20 g/L
pH final.....	7,2

3.7 Meio Mineral

Cada litro do meio sintético possuía a seguinte base de sais (Ramsay, *et al.*, 1990):

Na ₂ HPO ₄	3,50 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,20 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,01 g
Citrato férrico amoniacal.....	0,06 g
Solução de elementos traços.....	1 mL

Cada litro da solução de elementos traços continha:

H ₃ BO ₃	0,30 g
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0,20 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,10 g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,03 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O.....	0,03 g
NiCl ₂ .6H ₂ O.....	0,02 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,01 g

Ao meio de cultura sintético, foram adicionados, ainda, 10 g/L de Glicose e 9 g/L de Óleo de Soja como fontes de carbono para oferecer condições adequadas para crescimento celular e acúmulo de PHA e/ou produção de biossurfactantes.

3.8 Esterilização

As soluções e meios de cultura, em geral, foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 121 °C. As soluções de antibióticos trimetoprim e nistatina foram filtradas em filtro estéril com porosidade 0,22 µm (Millipore) e adicionadas ao meio de cultura após, este ter sido esterilizado. Óleo de soja foi esterilizado em forno a 180 °C por 1 hora.

3.9 Isolamento de Bactérias

O isolamento de microrganismos foi realizado a partir de amostras de lodo de esgoto industrial e doméstico e amostra de solo de rizosfera de tomateiro (solo de Cerrado). As amostras foram utilizadas para isolamento direto.

3.9.1 Isolamento direto

O isolamento direto consistiu em obter microrganismos a partir da suspensão da amostra de solo em solução salina, ou seja, sem o enriquecimento da amostra. Desta maneira, 5 mL de cada amostra foram transferidos de forma asséptica a frasco de erlenmayer contendo 45 mL de solução salina (NaCl 0,85%), submetido a banho de ultra-som por 12 minutos e agitada por 60 minutos. Esse ciclo de tratamento com ultra-som e agitação foi repetido por 2 vezes. Após os dois ciclos, a solução ficou em descanso durante 20 minutos, para sedimentação do material particulado. Foram realizadas diluições decimais em solução salina e as diferentes diluições foram inoculadas em meios de cultura ágar nutriente, PIA e meio oligotrófico (Aagot, *et al.*, 2001) sólidos para isolamento como observado na Figura 4.

Figura 4 - Isolamento de prováveis linhagens do gênero *Pseudomonas*.

3.10 Seleção de Linhagens de Prováveis *Pseudomonas*

Para selecionar prováveis linhagens do gênero *Pseudomonas*, utilizou-se o meio de cultura *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA-DIFCO). Todas as linhagens isoladas e purificadas foram testadas quanto à sua capacidade de crescer em meio PIA.

3.11 Seleção de Linhagens Produtoras de Biossurfactantes

Para avaliação da produção de biossurfactantes, foram utilizadas duas metodologias de seleção: o meio PPSW (Wild, *et al.*, 1997) e teste do colapso da gota (Bodour, *et al.*, 1998).

3.11.1 Meio PPSW, SW+O, SW+L e SW+GP.

Cada um dos isolados PIA positivos foi estriado em meio PPSW, bem como em meios SW (Siegmund & Wagner, 1991) e incubados a 30 °C por até 7 dias. Nos meios de cultura SW, foram utilizados ácido octanóico (SW+O), ácido láurico (SW+L) ou glicose e peptona (SW+GP) como fontes de carbono. Nos meios SW, a concentração de azul de metileno foi elevada em cem vezes. A formação de um halo de precipitado azul escuro ao redor da colônia indicou que houve produção de biossurfactante pelo microrganismo.

3.11.2 Teste do colapso da gota

Cada uma das linhagens bacterianas foi estriada em ágar nutriente e cultivada por 24 horas. Colônias isoladas foram utilizadas para inocular 2 mL de caldo nutriente e incubadas por 24 horas em placas multipoços (24 poços) para cultura de células. Após esse período, 100 µL de cada um dos isolados eram transferidos e cultivados em 2 mL de meio mineral (Ramsay, *et al.*, 1990) contendo glicose (10 g/L) ou óleo de soja (9 g/L) como única fonte de carbono em placas de cultura de células de 24 poços. Após 7 dias de cultivo, foi analisado o sobrenadante, obtido por centrifugação (10000 *xg*). Um sobrenadante proveniente de um cultivo de *E. coli* foi utilizado com controle negativo e uma solução 1 g/L de ramnolípido foi utilizada como controle positivo. A técnica do colapso da gota foi feita em tampas de placas de 96 poços. As tampas possuem 96 halos circulares. Antes de serem utilizadas, elas foram lavadas três vezes com água quente, etanol e água destilada e, em seguida, foram secadas. Depois da preparação, cada halo foi coberto com uma fina camada de óleo lubrificante 10W40 Helix[®] de 1,8 µL. A placa foi equilibrada por 24 horas em temperatura ambiente e 5µL do sobrenadante foram adicionados à superfície do óleo (Boduor e Miller-Maier, 1998). A forma da gota na superfície do óleo foi inspecionada após 1 minuto. Caso a gota permanecesse visualmente com a mesma forma inicial, o resultado seria considerado negativo. Caso a gota colapsasse, o resultado seria considerado positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.12 Preservação de Linhagens Bacterianas

Cada uma das linhagens bacterianas foi cultivada 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 (500 µL por tubo), que foram mantidos em congelador de refrigerador doméstico por 20 minutos e finalmente congelados em freezer -80 °C.

3.13 Cultivo de Bactérias sob Condições de Produção de Biossurfactante

Cada uma das linhagens bacterianas foi estriada em ágar nutriente e cultivada por 24 horas. Colônias isoladas foram utilizadas para inocular 25 mL de caldo nutriente e incubadas por 24 horas em agitador rotativo. 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 (glicose, cerca de 20 g/L ou 9 g/L de óleo de soja) e quantidade limitada da fonte de nitrogênio [(NH₄)₂SO₄ cerca de 1 g/L]. As células foram cultivadas por 96 horas e a cultura foi analisada quanto a: pH, massa seca celular, quantidade e composição de PHA. A produção de biossurfactante foi caracterizada pelas seguintes metodologias: colapso da gota, índice de emulsão, composição de ácidos graxos (CG), presença de carboidratos componentes de glicolipídios e atividade antimicrobiana.

3.13.1 Determinação de pH

O sobrenadante resultante do cultivo de cada linhagem era separado das células por centrifugação e, posteriormente, foi determinado o pH em um potenciômetro modelo TEC-2 (Tecnal), previamente calibrado com soluções padrão (pH 7,0 e 4,0).

3.13.2 Biomassa (Massa Seca Celular)

Amostras das culturas (10 mL) foram centrifugadas (10000 rpm, 10min. 4 °C), lavadas com água destilada, filtradas em membranas de 0,45 µm (Millipore) de porosidade e secas a 100 °C, por 5 horas. Após esse período, as membranas permaneceram durante 15 minutos no dessecador, foram pesadas e a massa seca celular (g/L) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$MS = \frac{(M_{cel} - M_{memb+ UM}) \times 1000}{\text{volume centrifugado}}$$

MS= massa seca celular (g/L)

Mcel= massa da membrana com as células (g)

Mmemb= massa da membrana sem células (g)

UM= umidade da membrana (g)

3.13.3 Determinação de PHA

Cerca de 10 mg de células liofilizadas foram submetidas à propanólise em tubo, ao qual foram adicionados 1 mL de solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 1 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40g/L) em propanol (Riis e Mai, 1988). Após vigorosa agitação, incubou-se a mistura em banho a 100 °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 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 (1:100), detectando-se os propil-ésteres por meio de ionizador de chama. As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 300 °C, respectivamente. Empregou-se um programa de temperatura da coluna para separar os propil-ésteres, que consistiu em 100 °C por 1 minuto, aumentando até 180 °C a uma razão de 8 °C/min e 180 °C por 15 minutos. O gás de arraste empregado foi hélio a uma vazão de 0,8 mL/min.

3.13.4 Caracterização de biossurfactantes

3.13.4.1 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado segundo Chen, *et al.* (2007) em duas etapas. Testes preliminares foram feitos para observar quais amostras de sobrenadantes das culturas de microrganismos apresentavam formação de emulsão. O teste preliminar foi determinado por misturar vigorosamente, por 1 minuto, em microtubos de centrífuga de 2 mL, 1 mL do sobrenadante da amostra da cultura de microrganismos com 0,5 mL de *n*-hexadecano. Após 24 horas, a 30°C, foi medida a percentagem da altura total ocupada pela emulsão. Um tubo controle foi preparado somente com o hexadecano e o meio de cultura. Para as amostras de sobrenadante que apresentavam emulsão em microtubos de centrífuga foi realizado o índice de emulsificação em maior escala com uma modificação à metodologia

sugerida por Cooper e Goldberg (1987). Para este teste, foram adicionados 4 mL de Hexadecano e 4 mL do sobrenadante da amostra da cultura de microrganismos a tubos de vidro de 13 mm de diâmetro, com fundo chato e tampas de rosca. Os tubos foram agitados por 2 minutos e deixados a 30°C por 24 horas e o Índice de Emulsificação foi medido através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicando por 100.

3.13.4.2 Presença de ácidos graxos

A presença de ácidos graxos foi determinada colocando 5 mL do sobrenadante em tubos de ensaio com tampa e congelando-os inclinados para que se formasse uma rampa, aumentando, assim, a superfície de contato. Após o congelamento, esse sobrenadante foi liofilizado e analisado por cromatografia de fase líquida (HPLC). Os carboidratos foram detectados através de índice de refração (Gomez, *et al.*, 1996). Um volume de 10 µL de amostra, adequadamente diluída para uma concentração entre 0 e 3 g/L e filtrada através de membrana de poro 0,22 µm (Millipore), foi injetada em cromatógrafo líquido (Waters 510 HPLC) equipado com coluna para determinação de açúcares (Shodex SH 1011). Os carboidratos separados foram identificados através do índice de refração diferencial (Waters 410 differential refractometer). A calibração do aparelho foi realizada com soluções contendo aproximadamente: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 2,0; 2,5; e 3,0 g/L de glicose. As condições de operação do aparelho foram as seguintes:

Temperatura do forno: 72°C

Pressão: <500 psi

Fase móvel: água purificada em sistema MilliQ (Waters- Millipore) contendo EDTA de cálcio e disódio ($C_{10}H_{12}N_2O_8CaNa_2$) para uma concentração igual a 0,01 mol/L.

Vazão da Fase Móvel: 0,6 mL/min.

3.13.4.3 Presença de glicolipídios

Os glicolipídios presentes no sobrenadante foram determinados por meio de uma hidrólise em que 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubos de ensaio com tampa e foram adicionados 100 µL de uma solução H_2SO_4 a 10 M. Essa solução foi aquecida a 98°C por tempos diferentes e, ao final, foram acrescentados 100 µL de uma solução de NaOH a 10 M. O sobrenadante, agora tratado, foi analisado segundo a metodologia descrita no item 3.13.3, utilizando soluções de ramnose como referência para detecção de possível ramnolipídios, bem como determinação de sua concentração.

3.13.4.4 Potencial para a biorremediação

Para avaliar o potencial de biorremediação de cada sobrenadante das culturas de microrganismos, 10 g de areia de praia, coletados no município de Santos – SP, foram propositalmente contaminados com 1 g de Petróleo (Petrobrás) e colocados em frascos opacos de 500 mL. À mistura, foram adicionados 500 µL de uma solução contendo 94,4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 8,8g/l de KH_2PO_4 e 0,01 mmol/L de H_2O_2 . Cada frasco foi suplementado com 1 mL do sobrenadante a ser testado e um tubo fundo cônico de 15 mL contendo 10 mL de solução $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a 0,025 mol/L para capturar o CO_2 resultante do processo de degradação do hidrocarboneto e do metabolismo bacteriano.

Foram feitos 4 microcosmos controles: (I) contendo apenas água e areia contaminada suplementada com a solução de sais e o peróxido de hidrogênio; (II) contendo água, areia, petróleo e peróxido sem a solução de sais; (III) contendo água, areia, petróleo e solução de sais, porém sem o H_2O_2 ; e (IV) contendo 1 mL de solução de 1000 mg/L de ramnolípido purificado, areia, petróleo, solução de sais e H_2O_2 .

O CO_2 que foi capturado nos tubos com solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,025N foi determinado por titulação do $\text{Ba}(\text{OH})_2$ residual, com HCl 0,05 mol/L e utilizando fenolftaleína (0,04% em etanol 70%) como indicador. O valor de CO_2 total capturado após um determinado período de tempo foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{CO}_2 \text{ (mg)} = (\text{Vol. HCl 1} - \text{Vol. HCl 2}) \times 2,2$$

sendo:

Vol. HCl 1 – volume de HCl para titular a solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ colocada nos tubos fundo cônico no início do período.

Vol. HCl 2 – volume de HCl para titular a solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ após decorrido o período de aprisionamento.

A biodegradação acumulada foi calculada somando-se todos os valores de CO_2 observados em cada um dos períodos analisados.

3.13.4.5 Medidas de tensão superficial

O sobrenadante dos cultivos para produção de biossurfactantes foram utilizados para determinar a tensão superficial medidas em tensiômetro *Fisher Scientific* modelo 21.

Foram utilizados 15 mL dos sobrenadantes das culturas de microrganismos. O aparelho foi calibrado utilizando um peso de 600 mg para zerá-lo. Água destilada e o meio de

cultura utilizado para o cultivo e produção de biossurfactantes foram utilizados como padrões para as medidas, que eram feitas por meio de um anel de platina, o qual era, primeiro, mergulhado em Cloroformio (J.T. Baker) e flambado para retirada de qualquer composto tensoativo ou qualquer composto que influenciasse nas médias.

O anel foi mergulhado a aproximadamente 1 mm abaixo da superfície do líquido testado e era gradualmente puxado para fora do líquido e, quando a ligação da superfície do líquido com o anel era rompida, as medidas de tensão foram tomadas.

Tais medidas eram parciais e necessitavam de um fator de correção, dado pela seguinte fórmula:

$$(F-a)^2 = 4b/(\pi R)^2 \times P / D-d + K \quad (1)$$

substituindo valores:

$$F = 0,7250 + \sqrt{[0,01452 / C^2(D-d)] + 0,04534 - (1,679r / R)} \quad (2)$$

F = fator de correção

R = raio do anel

r = raio do fio de platina que forma o anel (r = 0,01778 cm)

P = valor aparente da leitura de tensão superficial

D = densidade da fase líquida (fase inferior)

d = densidade da fase superior (ar)

K = 0,04534 – 1,679 r/R

C = circunferência do anel (C = 5,930)

a = 0,725

b = 0,0009075

R/r = 53,1218380

ρ_{H_2O} (0°C e 1atm) = 1000 g/L

ρ_{AR} (0°C e 1atm) = 1,293 g/L

3.14 Análise da Composição do Biossurfactante

A composição dos biossurfactantes foi determinada por meio de espectrometria de massa realizada com o produto da propanólise do sobrenadante das culturas dos microrganismos.

3.15 Caracterização Molecular das Bactérias Seleccionadas

Os isolados seleccionados foram caracterizados conforme descrito a seguir.

3.15.1 Extração de DNA genômico das bactérias seleccionadas

Para extração de DNA genômico das bactérias seleccionadas foi utilizado um produto comercial para purificação de DNA genômico da Invitrogen Corporation (PureLink Genomic DNA Purification Kit).

3.15.2 Amplificação da região 16S rDNA.

O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores 27f e 1401r como indicado por LANE (1991) e HEUER e colaboradores (1997). Para as reações de PCR foi empregado o Kit GoTaq® Green Master Mix de acordo a indicação de fabricante (Promega Corporation, Brasil): 2,5 µL de solução de DNA genômico contendo 35 ng/µl, 15 µL de GoTaq® Green Master Mix, 2,5 µL de iniciador 27f (10 µM) 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - LANE, (1991), 2,5 µL iniciador 1410r (10 µM) 5'CCG ATS GCI CCS AGI GAG TG, completando com água livre de nuclease para um volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). As condições de amplificação empregadas foram: uma desnaturação inicial por 2 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1min a 56 °C, 3 min a 72 °C e uma extensão final 10 min a 72 °C, conforme o indicado por MISBASH e colaboradores (2004).

3.15.3 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) de cálcio e sódio 0,5M e 1000 mL H₂O), realizadas a 80 V, 110 mA, 90 W, por aproximadamente 1 hora. Os

fragmentos de DNA foram corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) e observados no transiluminador de UV e fotodocumentador KODAK Gel Logic 100 Imaging System.

3.15.4 Isolamento de DNA a partir de gel de agarose

Para isolamento e purificação de DNA após a separação e visualização dos fragmentos por corrida eletroforética em gel de agarose, foram utilizados kits de purificação QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) e Invisorb Fragment CleanUp (Invitex).

3.15.5 Reação de seqüenciamento

Após a extração dos fragmentos amplificados do gel de agarose, estes foram utilizados para a reação de seqüenciamento com Abi Prism Big Dye Terminator (Applied Biosystems), empregando-se os mesmos iniciadores mencionados no item 3.15.2. Cada uma das fitas de DNA (forward e reverse) da amostra foi seqüenciada nas seguintes condições:

- Para um volume de 10 µL de reação:

Big Dye Ready Reaction Mix * 1,0 µL

Iniciador (3,2 pM) 1,0 µL

SM buffer 5x 3,0 µL

DNA (150ng-200ng) 4,0 µL

Água livre de nuclease 1,0 µL

As reações de seqüenciamento foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 96 °C por 1 minuto, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 segundos, anelamento a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos, este ciclo foi repetido 25 vezes.

3.15.6 Purificação dos produtos de extensão da reação de seqüenciamento

Cada um dos produtos de extensão da reação de seqüenciamento foi purificado por precipitação em 150 µL de isopropanol 75%. Após 15 minutos de repouso, as amostras foram centrifugadas por 50 minutos a 4000 rpm e à temperatura de 20°C. O sobrenadante foi descartado e, através de um spin invertido, o excesso de isopropanol foi eliminado. Posteriormente, a amostra foi precipitada em 150 µL de etanol 70% e centrifugada por 30

minutos a 4000 rpm e a 20 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e, através de um spin invertido, o excesso de etanol foi eliminado. A amostra foi submetida, então, à secagem por 30 minutos em estufa a 37 °C.

A cada amostra, foram adicionados 20 µL de formamida Hi Di (Applied Biosystems), as misturas foram submetidas à desnaturação por 4 minutos a 96 °C e suas bases multicoloridas fluorescentes foram analisadas no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer ABI Prism Sequencing Analysis Software.

Assim, a sequência de nucleotídeos obtida foi submetida a um alinhamento a partir da sequência de seus aminoácidos correspondentes (BLASTX) com aquelas depositadas na coleção de anotações de genomas do *GenBank*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização de Metodologia

4.1.1 Avaliação de metodologias para seleção de produtores de biossurfactante

Linhagens provenientes de um isolamento feito a partir de água de uma plataforma de petróleo em meio de cultura LBI foram utilizadas para avaliar as metodologias de seleção de produtores de biossurfactante. Cada uma das linhagens foi isolada em meio AN, recuperando-se 219 isolados. Essas foram cultivadas em meio PIA e obteve-se 46 linhagens capazes de crescer neste meio. Aquelas selecionadas como prováveis *Pseudomonas* (PIA positivas) foram utilizadas na padronização das técnicas de seleção de produtores de biossurfactantes. Foram testadas duas metodologias para seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes: colapso da gota (Bodour, *et al.*, 1998) e uso do meio de cultura PPSW (Wild, *et al.*, 1997).

4.1.1.1 Colapso da gota

Inicialmente, com objetivo de padronizar as condições em que seria avaliada a capacidade de colapso de uma gota de sobrenadante contendo o biossurfactantes sobre uma superfície hidrofóbica, foram realizados testes utilizando ramnolipídio purificado produzido pela linhagem bacteriana *P. aeruginosa* IPT 634 (Strelec, 2006). O ramnolipídio foi diluído em solução tamponada de bicarbonato (50 mM) para a concentração de 1000 mg/L e, a partir dessa, outras diluições foram preparadas (800, 600, 400, 200, 100, 75, 50 e 25 mg/L) para testar a quantidade de biossurfactante que poderia ser detectada por este método.

Neste experimento, também foram testados diferentes óleos como substância hidrofóbica na placa de 96 halos (Óleo lubrificante 10W40 Helix®, 20W50 Helix®, óleo mineral Enca® e Cisne®).

O óleo lubrificante 10W40 Helix® se revelou melhor que os demais, por detectar presença de biossurfactante até a concentração de 75 mg/L, enquanto os outros óleos testados apresentaram resultados pouco concisos.

O próximo passo foi padronizar o tempo de cultivo das linhagens. Foram feitos cultivos com 3 linhagens sendo que, dessas, havia um controle positivo (*P. aeruginosa* IPT 634 - Strelec, 2006) e dois controles negativos: *E. coli* e *S. aureus*. Os testes de colapso da gota foram realizados após 3, 5, 7 e 10 dias de cultivo das

bactérias. Obtiveram-se melhores resultados entre 5 e 10 dias de cultivo. Optou-se, então, em padronizar a técnica para 7 dias de cultivos.

Das 46 linhagens que eram capazes de crescer em meio PIA, 6 apresentaram colapso da gota, sendo que 5 foram obtidas a partir de culturas em meio mineral contendo óleo de soja e uma a partir de cultura em meio contendo glicose.

O teste de colapso da gota apresenta a vantagem de possibilitar visualizar o efeito direto do biossurfactante, por ser de fácil identificação, sendo que esse é imediato e, por ser um teste qualitativo, permite discernir de imediato se a bactéria é capaz ou não de produzir biossurfactante. Porém, é um teste que, apesar de ser relativamente simples de ser realizado, necessita do cultivo prévio do microrganismo em meios contendo diferentes fontes de carbono, se tornando de difícil execução quando há um grande número de isolados a serem testados. No entanto, sugere uma grande vantagem, sendo uma metodologia que possibilita que várias fontes de carbono diferentes podem ser testadas ao mesmo tempo para um mesmo microrganismo.

4.1.1.2 Meio PPSW

O meio PPSW foi descrito por Wild et al. (1997) para avaliação de bactérias produtoras de surfactantes aniônicos; contém um corante catiônico (azul de metileno) que se une com as pequenas moléculas aniônicas do biossurfactante na presença de um surfactante (Brometo de hexadecil trimetil amônio - CTAB), formando um precipitado azulado na placa de cultivo, permitindo a identificação de biossurfactantes aniônicos por meio da formação de halos devido à precipitação do corante (Wild et al., 1997).

Esse meio foi previamente utilizado em outros trabalhos do laboratório (Strelec, 2006) para detecção de bactérias produtoras de ramnolipídios. Por ter se revelado uma técnica rápida e eficaz, tal metodologia foi proposta para o presente trabalho.

As 46 bactérias PIA positivas foram cultivadas em PPSW e todas apresentaram crescimento satisfatório. Porém, nenhuma delas, mesmo aquelas cujo sobrenadante do cultivo provocou colapso da gota, apresentaram reação com o complexo de azul de metileno e CTAB.

Duas hipóteses foram cogitadas: ou o surfactante produzido não teria a capacidade de reagir com complexo azul de metileno-CTAB; ou a fonte de carbono

dada às bactérias não estimularia a formação de biosurfactante no meio PPSW, já que o carboidrato fornecido era glicose e que ainda havia peptona no meio.

Baseado no fato de que a maioria das bactérias cujo sobrenadante apresentou colapso da gota, até então, foram aquelas cultivadas em meio contendo fonte de carbono hidrofóbica (óleo de soja), foi proposto que a fonte de carbono fornecida às bactérias fosse trocada. Assim, foram realizados novos testes com o meio de cultura SW (Siegmund e Wagner, 1991) utilizando os ácidos láurico ou octanóico como fonte de carbono. Ainda foi preparado o meio SW com glicose como fonte de carbono contendo também peptona.

Outra mudança no meio foi proposta: aumentar a concentração de azul de metileno em cem vezes. Isto, porque o halo que se formava em PPSW era claro e de difícil visualização, enquanto que, com a concentração aumentada de azul de metileno, o precipitado era mais visível (Figura 5).

Figura 5 - Acima duas placas com 100 vezes mais azul de metileno e abaixo duas placas com a concentração de azul de metileno sugerida por Wild, *et al.* (1997).

As linhagens bacterianas que anteriormente apresentaram resultado positivo no teste do colapso da gota foram avaliadas em meio SW+ácido láurico e SW+ácido octanóico (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação da formação de halos indicativo da produção de biossurfactante em meio de cultura contendo azul de metileno e CTAB.

Isolado	SW + ácido láurico		SW + ácido octanóico	
	Crescimento	Halo	Crescimento	Halo
RMP062	+	-	+	-
RMP221	-	-	-	-
RMP225	+	+	+	+
RMP230	+	+	+	-
RMP292a	+	-	+	-
RMP292b	+	+	+	-

O isolado RMP221 não foi capaz de crescer nos meios de cultura SW+ácido láurico, nem em SW+ácido octanóico, enquanto os outros isolados foram capazes de crescer nesses meios de cultura. Utilizando ácido octanóico como fonte de carbono, foi possível detectar a produção de biossurfactante apenas para o isolado RMP 225, enquanto que, com ácido láurico como fonte de carbono, foi possível detectar a produção de biossurfactante em três dos isolados (RMP225, RMP230 e RMP292b). Assim, os resultados obtidos sugerem que a utilização de fontes de carbono hidrofóbicas em meio de cultura contendo azul de metileno e CTAB permitiu melhor detecção de bactérias produtoras de biossurfactantes quando comparada à utilização do meio PPSW, embora para alguns isolados o novo meio de cultura utilizado não supriu as condições necessárias para seu crescimento ou não permitiu detectar a produção de biossurfactante.

4.1.2 Avaliação da hidrofobicidade da superfície celular

4.1.3 Métodos de Avaliação do Biossurfactante

4.1.3.1 Composição do biossurfactante

Uma vez que glicolipídios representam o principal grupo de biossurfactantes (Desai e Banat, 1997), foram utilizadas metodologias para avaliação da produção desses compostos. As metodologias consistiram na avaliação da presença de ácidos graxos e de carboidratos no sobrenadante das culturas. Foi utilizada a metodologia de avaliação de ácidos graxos apresentada por Strelec (2006). Para a detecção de carboidratos, foi realizada a padronização descrita a seguir.

4.1.3.1.1 Presença de carboidratos

Para avaliar a presença de carboidratos no sobrenadante dos cultivos realizados, uma nova metodologia foi estabelecida. Nos glicolipídios, os carboidratos apresentam-se ligados a ácidos graxos, assim, a detecção depende de sua hidrólise prévia. O estabelecimento do procedimento de hidrólise foi baseado em duas patentes de métodos de produção de L-ramnose a partir de ramnolipídios (Daniels, *et al.*, 1990; Giani, *et al.*, 1996). Assim, foi preparada uma solução de ramnolipídio (1 g/L) e submetida à hidrólise. Para tanto, a 1mL da solução de ramnolipídio foram adicionados 100µL de uma solução de H₂SO₄ (10 M). A mistura foi aquecida a 98 °C por diferentes tempos, resfriada em banho de gelo e neutralizada com 100 µL de NaOH 10 M. Após filtração em membrana 0,45 µm, as amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido para detecção de açúcares. Nesse caso em particular, foi quantificada a concentração de ramnose com o objetivo de definir o tempo de hidrólise adequado (Figura 6).

Figura 6 - Concentração de ramnose com o objetivo de definir o tempo de hidrólise.

Os resultados obtidos sugerem que a hidrólise deve ocorrer por pelo menos 5 horas para liberação dos carboidratos. Deve-se destacar que essa mesma metodologia deverá ser utilizada na detecção de outros carboidratos presentes no sobrenadante. Assim, caso outros picos não correspondendo à ramnose sejam detectados na análise por HPLC, esses deverão ser submetidos a análise por espectrometria de massa para identificar o carboidrato componente do glicolipídio.

4.2 Isolamentos

Bactérias foram isoladas a partir de amostra de lodo ativado de esgoto industrial e lodo de esgoto doméstico e, ainda, de solo de rizosfera de tomateiro (**Tabela 3**). Estes locais de coleta foram escolhidos devido ao fato de que esgoto industrial recebe vários tipos diferentes de compostos hidrofóbicos e tal fato poderia já selecionar bactérias capazes de degradar esses compostos e, por conseguinte produzir biossurfactantes para disponibilizar os nutrientes presentes naquele meio, da mesma forma que o lodo de esgoto doméstico, uma vez que recebe compostos hidrofóbicos tais como óleos vegetais utilizados em frituras e preparo de alimentos. O solo de rizosfera de tomateiro foi escolhido para prospecção de linhagens devido ao fato de que o cultivo de tomates exige a aplicação de grandes quantidades de agrotóxicos para controle de pragas e tais compostos possuem componentes que poderiam selecionar bactérias produtoras de biossurfactantes. Todos estes ambientes, teoricamente, são locais impactados por hidrocarbonetos, porém, diferentes de hidrocarbonetos fósseis (derivados de petróleo) e que são poluentes destes ambientes. Para tanto seria importante encontrar bactérias produtoras de biossurfactantes em tais locais, até mesmo como forma de, no futuro, propor medidas mitigadoras em solos impactados por agrotóxicos (organoclorados) e para esgotos.

Após o processamento das amostras, diferentes diluições foram inoculadas em três meios de cultura diferentes: um meio de cultura rico (ágar nutriente) e um meio de cultura seletivo para bactérias do Gênero *Pseudomonas* (PIA). A diluição de micropropágulos e sua inoculação em meios de cultura específicos para o isolamento de oligotróficos também foram utilizadas com o objetivo de superar a “grande anomalia da placa de contagem” (Staley e Konopka¹, 1985 *apud* Bull, *et al.*, 2000).

O isolamento resultou em 1.804 linhagens purificadas, das quais 763 foram capazes de crescer em meio *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA). Essas foram avaliadas quanto à produção de biossurfactantes.

¹ Staley e Konopka....(Referencia no rodapé)

Tabela 3 - Locais de coleta, identificação dada às cepas isoladas e porcentagem de prováveis *Pseudomonas*.

ISOLAMENTOS		
LOCAL	Linhagens Isoladas	PIA
Lodo Ativado de Esgoto Industrial	429	309 (72,0%)
Lodo Ativado de Esgoto Doméstico	853	472 (53,0%)
Solo de Rizosfera - Cultivo de Tomates	212	118 (55,2%)
TOTAL	1713	944 (55,3%)

4.3 Avaliação da Produção de Biossurfactantes

A partir da amostra de lodo de esgoto industrial, foram isoladas 429 cepas. Todas foram cultivadas em PIA e 309 cepas cresceram. Estas foram cultivadas em caldo nutriente e subcultivadas em meio mineral com glicose ou óleo de soja para avaliação da produção de biossurfactantes pelo teste do colapso da gota e cultivadas em meio PPSW. Das 309 cepas cultivadas em meio PPSW, nenhuma apresentou formação de halos, apesar de todas apresentarem crescimento satisfatório no meio.

Simultaneamente a este teste, o teste de colapso da gota foi realizado. Dentre os 309 isolados avaliados, 11 foram positivos para colapso quando cultivados com glicose, 42 quando cultivados com óleo de soja e 8 foram positivos quando cultivados em ambos os meios (Tabela 4).

As 45 linhagens positivas foram recultivadas em meio PPSW e cultivadas em meio SW+O e SW+L (Tabela 4). Em meio PPSW, nenhuma das linhagens apresentou halo, confirmando os resultados tidos anteriormente durante a padronização desta metodologia, porém em meio SW+O, 3 apresentaram halo e em meio SW+L, 25 apresentaram halo. Todas as linhagens que obtiveram halo em meio SW+O também apresentaram halo em meio SW+L. Outro fato que pode ser destacado é que nem todas as linhagem apresentam crescimento nos meios contendo ácido láurico e ácido octanóico. Das 45 linhagens testadas, 6 foram incapazes de crescer em ambas as fontes de carbono. Além destas 6, outras 5 não foram capazes de crescer em meio contendo ácido octanóico.

Assim, os resultados demonstram que a fonte de carbono fornecida é um componente essencial que determina ou não a produção de biossurfactante, sendo crucial sua definição em um protocolo experimental que pretende isolar microrganismos produtores destas substâncias.

Tabela 4 - Resultado dos testes de seleção para isolados de lodo de esgoto industrial.

Isolado	Colapso da gota	PPSW		SW+L		SW+O	
		Crescimento	Halo	Crescimento	Halo	Crescimento	Halo
RMP193	+ OS	+	-	+	-	+	-
RMP296	+G	+	-	+	+	+	-
RMP297	+G	+	-	+	+	+	-
RMP304a	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP309	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP311	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP 317	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP328	+OS	+	-	-	-	-	-
RMP334	+OS	+	-	-	-	-	-
RMP348	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP353a	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP353b	+G/OS	+	-	+	-	-	-
RMP354	+OS	+	-	+	-	-	-
RMP358	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP360	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP362a	+OS	+	-	-	-	-	-
RMP363a	+OS	+	-	-	-	-	-
RMP365	+OS	+	-	-	-	-	-
RMP375	+OS	+	-	+	-	-	-
RMP377	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP433	+OS	+	-	+	-	-	-
RMP437	+OS	+	-	+	-	-	-
RMP467a	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP480	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP481a	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP481b	+G/OS	+	-	+	+	+	-
RMP483	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP492	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP499a	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP499b	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP512aII	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP520	+G/OS	+	-	+	+	+	+
RMP521b	+OS	+	-	-	-	-	-
RMP529	+G/OS	+	-	+	-	+	-
RMP531b	+G/OS	+	-	+	+	+	+
RMP535a	+G/OS	+	-	+	-	+	-
RMP536	+G/OS	+	-	+	-	+	-
RMP541	+OS	+	-	-	-	-	-
RMP546	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP548	+OS	+	-	+	+	+	-
RMP550	+OS	+	-	+	+	+	+
RMP572	+G/OS	+	-	+	-	-	-
RMP602	+OS	+	-	+	-	+	-
RMP603	+OS	+	-	+	-	+	-

Todas as linhagens testadas e que apresentaram halos, foram avaliadas novamente para confirmação. Algumas dessas linhagens deixaram de apresentar halos quando testadas em seqüência. Tal evento já havia ocorrido em trabalhos anteriores a este, que utilizaram a mesma metodologia de seleção (Strelec, 2006). Suspeitou-se que estivesse ocorrendo um fenômeno no qual a produção de biosurfactane dependesse do co-cultivo de diferentes isolados em uma mesma placa. Assim, o teste foi repetido com as mesmas bactérias nas mesmas posições iniciais e novamente não se obteve halos como os obtidos no primeiro teste realizado. Desta forma, permanece a dúvida do que deve provocar esse fenômeno de instabilidade na produção de biosurfactante.

Partindo da amostra de Lodo de Esgoto Doméstico, 832 linhagens foram isoladas, sendo que, destas, 451 foram capazes de crescer em meio PIA. Essas foram cultivadas em meio SW+O, SW+L e SW+GP e 64 linhagens apresentaram halo, sendo que: nenhuma linhagem apresentou halo em SW+L; 32 linhagens apresentaram halo em SW+O e SW+GP; 6 somente em SW+O; e 26 em SW+GP. Todas as 451 linhagens selecionadas foram cultivadas para realização do teste de colapso da gota, 174 delas apresentaram colapso da gota. Sendo que 94 delas só apresentaram colapso de gota quando cultivadas em meio mineral com óleo de soja; 35 quando cultivadas em meio com glicose; e 45 apresentaram colapso quando cultivada com ambas as fontes de carbono. Ao final dos testes apenas 20 linhagens apresentaram halos em SW e colapso da gota, enquanto 36 linhagens apresentaram halo em SW porém não foram positivas em colapso da gota.

Da amostra de solo proveniente de rizosfera de cultivo de tomateiro, foram isoladas 212 linhagens, as quais 118 cresciam em PIA. Em um primeiro teste com os meios SW, foram obtidas 18 linhagens produtoras de halo com octanoato e com ácido láurico. Porém, em um segundo teste, apenas 10 linhagens confirmaram produção de halo. Todas as 212 linhagens selecionadas foram cultivadas para realização do teste de colapso da gota, 5 delas apresentaram colapso da gota. Sendo que uma delas só apresentou colapso de gota quando cultivadas em meio mineral com óleo de soja; 4 quando cultivadas em meio com glicose; e nenhuma apresentou colapso quando cultivada com ambas as fontes de carbono. Todas as linhagens positivas no teste do colapso da gota apresentaram formação de halo quando cultivadas em meio SW.

Tabela 5 - Análise geral dos métodos de seleção.

Amostras prospectadas	Meio SW				Colapso da gota			Biossurfactantes totais
	SW+O	SW+L	SW+GP	TOTAL	MM+OS	MM+G	TOTAL	
Lodo de Esgoto Industrial	3*	25*	0	25*	50	19	61	36
Lodo de Esgoto Doméstico	38	0	58	64	139	80	174	208
Solo de Risosfera Tomateiro	10	10	0	10	1	4	5	10

*- valores parciais, pois somente aqueles que foram positivos em Colapso da gota foram testados nestes meios.

Um fato acerca dos dois métodos de seleção deve ser ressaltado quando ambos são realizados com o mesmo grupo de isolados: eles apresentam resultados por vezes antagônicos. Alguns isolados que apresentam colapso de gota não apresentam halo no meio SW e alguns isolados que apresentam halo não apresentam colapso de gota. Assim, os dois testes podem ser complementares com alguma sobreposição entre eles, exigindo para uma boa análise de um conjunto de isolados a utilização das duas metodologias.

4.4 Produção

Os isolados de *Pseudomonas* (PIA positivos) e selecionados como produtores de biossurfactantes - seja pela formação de halos em meio SW, seja pelo método de colapso da gota - foram cultivados em meio mineral contendo glicose ou óleo de soja como fonte de carbono com o objetivo de caracterizar os isolados com relação ao biossurfactante produzido, bem como à produção simultânea de polihidroxialcanoatos.

Para a realização dos ensaios de produção foram escolhidos 112 isolados que apresentaram melhores resultados durante os testes de seleção.

4.4.1 Isolados que não confirmam a produção de compostos tensoativos

Quando os ensaios de produção foram concluídos, 25 isolados testados não confirmaram produção de compostos tensoativos, não apresentando resultados positivos no teste de colapso da gota e índice de emulsificação (E24). No entanto, para as linhagens RMP-647B e RMP-499AI são detectados picos de 3-hidróxidecanoato (3HD), porém em quantidades muito baixas (abaixo de 0,3 mg/mL). Nas linhagens RMP-521B, RMP-1043 e RMP-1160 foram detectados picos de 3HO e 3HDD, também em baixas quantidades. Destas 25 linhagens mencionadas, apenas 3

apresentaram produção de PHA que variou entre 9,49% MSC até 68,64% MSC. Embora tenha sido detectado um teor elevado de PHA para o isolado RMP1325 (cerca de 68% da massa seca celular), esse PHA ainda representa uma pequena quantidade, pois a massa seca celular atingiu apenas 0,25 g/L

4.4.2 Isolados produtores de compostos tensoativos

Dos 112 isolado que foram avaliados para a produção de tensoativos, 87 confirmam a capacidade de produzir estes compostos.

É interessante notar que para alguns dos sobrenatantes detecta-se atividades pelo teste de Colapso da gota, porém para índice de emulsificação estas atividades não são confirmadas por não haver a formação de emulsão e vice-versa. Deve-se levar em conta que estes testes avaliam propriedades diferentes para os compostos tensoativos. Chen, *et al.* (2007) discute o fato de existirem biossurfactantes que podem estabilizar (emulsificantes) e outros que podem desestabilizar (desemulsificantes) as emulsões, o que poderia justificar o fato de se detectar propriedades tensoativas no colapso da gota e o fato de haver algumas emulsões mais estáveis que outras.

Das 87 linhagens com propriedades tensoativas 67 delas apresentaram índice de emulsificação em microtubos (Figura 7). Quando testadas quanto ao colapso da gota 70 linhagens foram positivas e de todas as linhagens testadas, 57 foram positivas nos testes de colapso da gota e índice de emulsificação ao mesmo tempo.

Figura 7 - Teste de índice de emulsificação realizado em microtubos de centrífuga para observar quais linhagens possíam sobrenadante capaz de formar emulsões.

Porém, nos testes em maior escala, que foram feitos em tubos de vidro de 13mm de diâmetro, somente 24 dos sobrenatantes testados apresentaram E24 que variaram entre 30 e 90. Além disso, 31 linhagens apresentaram índices que variavam de 4 a 20, outros 24 sobrenatantes testados apresentaram formação de emulsão em microtubos de polipropileno e não apresentaram emulsão quando testados em tubos de vidro (**Figura 8**).

Figura 8 - Índice de emulsificação observado nas linhagens RMP-1484, RMP-1477, RMP-1469, RMP-1480 e RMP-1478, respectivamente, quando observados em tubos de vidro com 13mm de diâmetro.

Essa variação do comportamento das emulsões fez com que duas hipóteses fossem levantadas. Primeiro, a composição dos recipientes que foram utilizados para realização dos testes (microtubo de polipropileno e tubo de vidro) pode ter afetado na estabilidade da emulsão; segundo, as proporções utilizadas para realização dos testes foram diferentes. Nos testes preliminares, foram utilizados 1,5mL do sobrenadante para 0,5mL de hexadecano, nos testes em maior escala foi utilizado 4mL de sobrenadante para 4mL de hexadecano. Logo, a variação na proporção sobrenadante/hexadecano pode ter alguma influência na formação e estabilidade da emulsão. Esta metodologia é largamente utilizada por pesquisadores que buscam biossurfactantes. Rosenberg, *et al.* (1979) e Cooper e Goldeberg (1987) foram os primeiros a utilizar esta metodologia. Os primeiros utilizavam proporções iguais de suspensão de biossurfactantes e substância hidrofóbica, enquanto estes últimos utilizavam proporções diferentes (4:6). Toren, *et al.* (2001), Bonilla, *et al.* (2005) e Chen, *et al.* (2007) utilizam a metodologia de E24 em microtubos e não mencionam nenhuma provável diferença em seus resultados devido ao fato de o teste ter sido realizado em microtubos de polipropileno e não em tubos de vidro. Singh, *et al.* (2007) relatam que alguns fatores podem influenciar na estabilidade da emulsão, tais como viscosidade, volume do líquido a ser testado, a razão entre os volumes do líquido e do hidrocarboneto, temperatura, pH, tipo de agente emulsificante presente na amostra, diferenças de densidade do líquido e tempo de agitação.

É interessante notar que alguns isolados, embora tenham apresentado evidência da produção de tensoativos (ácidos graxos detectados no sobrenadante), não

apresentaram qualquer atividade emulsificante em seu sobrenadante. O teste de índice de emulsificação realizado com a linhagem *P. aeruginosa* IPT634, produtora de ramnolipídio (Strelec, 2006), demonstrou que o biossurfactante produzido por essa bactéria apresenta uma forte capacidade emulsificante (dados não apresentados).

4.4.2.1 Isolados produtores ramnolipídios

A análise do sobrenadante para presença de ácidos graxos normalmente encontrados em ramnolipídios demonstrou que em 31 linhagens, das 87 que apresentaram atividades tensoativas, foi detectada a presença de 3-hidroxidecanoato (3HD) (Tabela 7). Uma vez que esse é o principal ácido graxo presente em ramnolipídios (Soberón-Chávez, *et al.*, 2005), é bastante provável que essas linhagens sejam capazes de produzir ramnolipídios. A concentração de 3-hidroxiácidos (3HA) detectados como componente de ramnolipídio correspondeu a valores superiores a 1g/L em pelo menos 25 linhagens testadas. Deve-se destacar que foi avaliado somente os 3-hidróxiácidos e, se for considerado que estes estão ligados às moléculas de ramnose, a quantidade de ramnolipídio produzido é ainda maior que a avaliada (superior a 1,9g/L se considerarmos um di-ramnolipídio contendo 3HD). A quantidade de 3HA detectada em alguns cultivos atingiu valores bastante elevados (maior que 3g/L). O principal 3HA detectado no sobrenadante foi o 3HD, exceto para as linhagens RMP-1336 e RMP-1340 nas quais se detectou, principalmente 3HDd.

Os sobrenadantes que foram analisados para a presença de 3HA não foram analisados para a presença de açúcares. Caso estas análises tivessem sido feitas, a detecção de ramnose corroboraria a produção de ramnolipídios por estes isolados.

Considerando que 3HA também são encontrados em lipopeptídios cíclicos (CLP) (Raaijmakers, *et al.*, 2006), não pode ser descartada a hipótese que estes isolados estejam produzindo estas substâncias ou, ainda, misturas de ramnolipídios e CLPs.

Considerando que a atividade de RhIA é significativamente maior para 3HD-ACP, conforme apresentado por Zhu e Rock (2008), a expectativa é que 3HD seja o principal constituinte de ramnolipídios. Logo, as linhagens RMP-1336 e RMP-1340 podem ser prováveis produtoras de outros compostos, tais como os CLPs.

Uma vez que muitas bactérias produtoras de ramnolipídios são capazes de produzir polihidroxialcanoatos, foi realizada a análise desses compostos nas células

destes mesmos cultivos (Tabela 7). Pelo menos 23 dos isolados produtores de ramnolipídios foram capazes de produzir quantidades expressivas de PHA_{MCL}.

Strelec (2006) avaliou a produção de simultânea de PHA e ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas* de solo de Mata Atlântica. Os resultados obtidos indicam que bactérias capazes de sintetizar eficientemente 3-hidroxiácidos podem incorporá-los tanto em PHA como em ramnolipídios. Por outro lado, somente bactérias com capacidade reduzida de produção de PHA podem direcionar eficientemente parte da fonte de carbono para a produção da ramnose presente no ramnolipídio. Chayabutra e Ju (2001) avaliaram a produção de PHA e ramnolipídios por *P. aeruginosa* ATCC 10145. A síntese de PHA foi observada durante a fase de crescimento celular, enquanto a produção de ramnolipídios foi observada apenas durante a fase estacionária. Hori e colaboradores (2002) avaliaram a produção simultânea de polihidroxialcanoatos (PHA) e ramnolipídios por *P. aeruginosa* IFO3924 utilizando decanoato como fonte de carbono. O maior conteúdo de PHA foi observado imediatamente após a exaustão da fonte de carbono, enquanto a concentração de ramnolipídios continuou aumentando mesmo após a exaustão da fonte de carbono. Marsudi, *et al.* (2008) avaliaram produção simultânea de PHAs e RHLs fornecendo óleo de palma, ou ácido oleico ou glicerol. A quantidade de polihidroxialcanoato 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. Os autores propõem que a produção simultânea representa uma estratégia de reduzir os custos de produção e esta estratégia foi objeto da patente depositada por Hori e Unno (JP 052368, de 2003). Entretanto, considerando que os produtos apresentam picos de produção em momentos diferentes do cultivo, essa estratégia parece não representar um ganho econômico real.

Tabela 6 - Produção de ramnolipídios e polihidroxicanoatos por bactérias isoladas.

Linhagem bacteriana (RMP)	Fonte de carbono	MSC (g/L)	Polihidroxicanoatos				Ramnolipídios ^a						Colapso da gota	E24
			Composição (mol%)				PHA (%MSC)	Composição (mol%)				Conc. (g/L)		
			3HHx	3HO	3HD	3HDD		3HHx	3HO	3HD	3HDD			
RMP225	Glicose	1,50	0,00	Tr	100,00	Tr	10,39	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
	O. soja	2,17	0,00	34,90	65,10	Tr	11,92	0,00	2,90	97,10	0,00	1,46	+	ND
RMP1201B	Glicose	1,77	0,00	9,81	90,19	Tr	14,27	0,00	7,13	80,74	12,14	0,84	-	57(94)
	O. soja	2,32	0,00	34,16	65,84	Tr	16,26	0,00	3,09	90,23	6,68	1,69	+	-
RMP1232	Glicose	1,53	0,00	7,96	92,04	Tr	12,53	0,00	6,54	84,66	8,80	1,39	-	57(93)
	O. soja	4,08	Tr	28,14	71,86	Tr	22,89	0,00	3,07	89,56	7,37	1,31	+	-
RMP1235	Glicose	0,97	0,00	9,89	90,11	Tr	13,29	0,00	6,46	83,63	9,91	1,26	+	57(96)
	O. soja	3,82	3,46	25,09	60,83	10,62	29,37	0,00	3,36	89,62	7,02	1,35	+	+
RMP1253	Glicose	1,45	0,00	0,00	100,00	0,00	5,61	0,00	0,00	100,00	0,00	0,05	+	-
	O. soja	3,56	0,00	31,25	57,48	11,27	25,89	0,00	3,23	89,93	6,84	1,64	+	-
RMP1256	Glicose	1,93	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	8,14	82,28	9,59	0,85	+	-
	O. soja	2,94	0,00	Tr	100,00	0,00	20,04	0,00	3,66	89,37	6,97	2,41	+	+
RMP1267	Glicose	1,70	0,00	Tr	100,00	0,00	12,27	0,00	6,43	80,38	13,19	0,87	+	57(96)
	O. soja	2,44	Tr	27,71	72,29	Tr	30,51	0,00	3,69	89,73	6,58	1,79	-	-
RMP1300	Glicose	1,91	0,00	9,38	90,62	Tr	13,31	0,00	5,61	86,43	7,96	1,29	+	55(93)
	O. soja	3,76	3,61	27,03	59,30	10,06	33,62	0,00	4,38	87,82	7,80	1,21	-	-
RMP1303	Glicose	2,19	0,00	Tr	79,32	20,68	20,85	0,00	6,31	84,08	9,61	0,80	-	60(96)
	O. soja	4,08	Tr	25,29	65,15	11,55	27,24	0,00	3,75	86,76	9,49	0,52	+	-
RMP1305	Glicose	1,87	0,00	15,30	84,70	Tr	15,06	0,00	6,72	82,13	11,15	1,30	+	53(93)
	O. soja	3,26	Tr	26,45	73,55	Tr	27,11	0,00	4,43	87,07	8,50	1,06	+	-
RMP1312	Glicose	1,79	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	5,58	81,51	12,71	0,80	+	57(93)
	O. soja	2,73	0,00	29,24	70,76	Tr	12,56	0,00	3,03	89,98	6,99	1,28	+	+

a - Ramnolipídios foram determinados apenas os 3-hidroxiácidos no sobrenadante do cultivo MSC – Massa seca celular 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDD – 3-hidroxidodecanoato 3HA – 3-hidroxicanoatos detectados no sobrenadante 3HA/Ram – relação 3-hidroxicanoatos e ramnose detectados no sobrenadante
 Tr- traços ND – não determinado, análise sendo realizadas.

(Continua)

Tabela 6 (Continuação).

Linhagem bacteriana (RMP)	Fonte de carbono	MSC (g/L)	Polihidroxicanoatos				Ramnolipídios ^a					Colapso da gota	E24	
			Composição (mol%)				PHA (%MSC)	Composição (mol%)						Conc. (g/L)
			3HHx	3HO	3HD	3HDd		3HHx	3HO	3HD	3HDd			
RMP-1313	Glicose	1,64	0,00	Tr	100,00	Tr	12,37	0,00	6,78	84,74	8,48	1,35	+	ND
	O. soja	3,26	Tr	29,07	70,93	Tr	19,60	0,00	2,98	90,34	6,68	1,58	+	ND
RMP1315	Glicose	0,58	0,00	Tr	100,00	Tr	6,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
	O. soja	3,44	Tr	45,11	54,89	Tr	7,16	0,00	0,00	100,00	0,00	1,31	+	57
RMP1316	Glicose	0,66	0,00	0,00	100,00	0,00	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	4
	O. soja	2,27	2,59	22,39	67,35	7,67	25,10	0,00	0,00	100,00	0,00	4,30	+	40
RMP-1321	Glicose	1,20	0,00	0,00	100,00	0,00	2,30	0,00	0,00	100,00	0,00	0,03	+	ND
	O. soja	4,93	3,26	24,82	59,36	12,57	34,26	0,00	5,670	84,24	10,07	0,57	+	ND
RMP1322	Glicose	1,50	0,00	0,00	100,00	0,00	2,60	0,00	0,00	100,00	0,00	0,03	+	-
	O. soja	4,52	Tr	27,75	61,14	11,11	26,49	0,00	4,99	86,40	8,61	0,97	+	4(47sobr.)
RMP1330	Glicose	1,65	0,00	11,36	88,64	0,00	14,49	0,00	5,01	67,96	27,03	1,30	+	57(93)
	O. soja	2,99	3,36	28,42	56,14	12,07	27,52	0,00	3,20	89,69	7,11	1,31	-	-
RMP1336	Glicose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
	O. soja	3,90	0,00	17,77	82,23	0,00	10,68	0,00	Tr	34,15	65,85	0,47	+	ND
RMP-1340	Glicose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
	O. soja	3,23	0,00	22,28	62,01	15,71	17,42	0,00	0,00	39,72	60,28	0,61	+	ND
RMP1349	Glicose	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	-
	O. soja	4,51	Tr	18,76	70,32	10,92	25,29	0,00	3,42	89,23	7,35	1,56	+	10
RMP1470	Glicose	1,01	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	8,51	83,55	7,93	1,35	-	9
	O. soja	1,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	54

a. Ramnolipídios foram determinados apenas os 3-hidroxiácidos no sobrenadante do cultivo. a - Ramnolipídios foram determinados apenas os 3-hidroxiácidos no sobrenadante do cultivo MSC – Massa seca celular 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDD – 3-hidroxidodecanoato 3HA – 3-hidroxicanoatos detectados no sobrenadante 3HA/Ram – relação 3-hidroxicanoatos e ramnose detectados no sobrenadante Tr- traços ND – não determinado, análise sendo realizadas.

(Continua)

Tabela 6. (Continuação).

Linhagem bacteriana (RMP)	Fonte de carbono	MSC (g/L)	Polihidroxicanoatos				Ramnolipídios ^a					Conc. (g/L)	Colapso da gota	E24
			Composição (mol%)				PHA (%MSC)	Composição (mol%)						
			3HHx	3HO	3HD	3HDd		3HHx	3HO	3HD	3HDd			
RMP1476	Glicose	1,54	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	(49)5
	O. soja	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,30	13,56	80,14	0,00	0,28	+	-
RMP1480	Glicose	2,14	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	8,46	83,55	7,99	1,33	+	55(88)
	O. soja	5,96	ND	ND	ND	ND	ND	6,11	12,94	80,95	Tr	0,26	+	-
RMP1481	Glicose	1,85	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	8,66	82,62	8,72	1,07	+	4(53)
	O. soja	1,50	Tr	28,84	71,16	Tr	4,44	0,00	13,66	86,34	0,00	0,22	+	-
RMP1482	Glicose	2,60	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	8,27	84,25	7,48	1,46	+	58(91)
	O. soja	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,87	84,13	0,00	0,19	+	-
RMP1484	Glicose	1,98	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	5,27	84,50	10,23	1,48	+	-
	O. soja	1,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tr	100,00	Tr	0,18	+	55(68)
RMP1485	Glicose	0,90	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	6,26	84,41	9,34	2,82	+	56(92)
	O. soja	5,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tr	100,00	0,00	0,19	+	4
RMP1486	Glicose	1,89	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	4,16	70,03	25,80	1,69	+	-
	O. soja	2,18	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	Tr	100,00	0,00	0,20	+	53(75)
RMP1487	Glicose	2,55	Tr	25,50	74,50	Tr	22,11	0,50	8,38	79,56	11,56	3,15	+	59(84)
	O. soja	0,93	ND	ND	ND	ND	ND	2,97	7,75	77,92	11,36	0,42	+	-
RMP1488	Glicose	2,38	Tr	28,82	71,18	Tr	27,58	0,00	6,14	59,77	34,09	4,94	+	58(72)
	O. soja	1,38	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	Tr	100,00	0,00	0,27	+	-
RMP1489	Glicose	2,14	Tr	24,35	75,65	Tr	24,23	0,00	6,74	73,85	19,41	3,05	+	56(93)
	O. soja	4,82	0,00	34,62	65,38	0,00	2,44	0,00	Tr	83,79	16,21	0,54	+	57(72)

a. Ramnolipídios foram determinados apenas os 3-hidroxiácidos no sobrenadante do cultivo. a - Ramnolipídios foram determinados apenas os 3-hidroxiácidos no sobrenadante do cultivo MSC – Massa seca celular 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxi decanoato 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato 3HA – 3-hidroxi alcanoatos detectados no sobrenadante 3HA/Ram – relação 3-hidroxi alcanoatos e ramnose detectados no sobrenadante Tr- traços ND – não determinado, análise sendo realizadas.

(Conclusão)

Soberón-Chávez e colaboradores (2005) afirmam que a composição de 3-hidróxiácidos presentes nos ramnolipídios produzidos por bactérias não variam em função da fonte de carbono fornecida e sugerem que esse comportamento resulta do fato de que apenas a biossíntese de ácidos graxos forneceria intermediário para a biossíntese de RHL. Ou seja, mesmo quando ácidos graxos são supridos, estes são inicialmente convertidos a acetil-CoAe posteriormente transformados nos intermediários necessários à síntese do ramnolipídio pela via de biossíntese de ácidos graxos. Zhu e Rock (2008) confirmam esse modelo metabólico, uma vez que demonstraram que RhlA apresenta atividade apenas com 3HA ligado a ACP.

Resultados de Strelec (2006) não corroboram essa hipótese, uma vez que observou diferença na composição do ramnolipídio produzido a partir de carboidratos daquele produzido a partir de óleo de soja, que sugere que a β -oxidação de ácidos graxos pode, de alguma forma, estar contribuindo com intermediários para a biossíntese de ramnolipídios.

Com o objetivo de verificar estas hipóteses foram comparadas as composições de 3HA de 12 linhagens que produziram pelo menos 0,5g/L de ramnolipídio em cada uma das fontes de carbono avaliadas. A **Figura 9** representa os resultados desta análise.

Figura 9 - Comparação das composições de 3HA na produção de PHA e RHL de 12 linhagens.

Como se verifica, o 3HD representa uma fração maior no ramnolipídio produzido a partir de óleo de soja quando comparado àquele obtido a partir de carboidratos. Por outro lado o 3HO e o 3HDd representam frações maiores nos RHLs produzidos a partir de carboidratos que os obtidos a partir de óleo de soja.

Estes dados são compatíveis com diferenças na especificidade dos sistemas de transferência de 3HA para a biossíntese de RHL quando óleos vegetais ou

carboidratos são fornecidos e sugerem que a biossíntese de 3HA presentes em RHL não ocorrem exclusivamente a partir da biossíntese de ácidos graxos.

Diferenças na composição de 3HA no PHA também foram analisadas (**Figura 9**). Observou-se que 3HD representa uma fração maior no PHA produzido a partir de carboidratos quando comparado àquele produzido a partir de óleo de soja, enquanto que para 3HO é observado o contrário.

Estes resultados sugerem que o direcionamento de intermediários das vias de metabolismo de ácidos graxos para a biossíntese de PHA e ramnolipídios são pelo menos parcialmente independentes.

As linhagens RMP-1315, RMP-1481 e RMP-1489 foram selecionadas para estudos mais detalhados de caracterização das substâncias tensoativas produzidas.

4.4.2.2 Isolados produtores de compostos tensoativos diferentes de ramnolipídios

Foi possível observar que 56 linhagens testadas apresentaram atividades tensoativas após o cultivo, porém não apresentaram picos característicos de ácidos graxos característicos de ramnolipídios. Cromatogramas relativos à análise de ácidos graxos dessas amostras foram avaliados.

Em diversos cultivos em óleo de soja foi possível detectar, por cromatografia gasosa de propil ésteres, apenas um pico com tempo de retenção de 24,9 minutos. Entretanto esse mesmo pico era observado existindo ou não propriedades tensoativas no sobrenadante. Portanto, não é possível correlacionar as propriedades tensoativas ao pico observado.

Quando foi feito o cultivo das linhagens em meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono foi possível subdividir as linhagens testadas em 3 grupos com base em picos observados na cromatografia gasosa, que se encontram reunidos na Tabela 7.

O primeiro grupo foi daquelas linhagens que apresentavam atividade tensoativa, mas nenhum pico, pode ser associado a estas propriedades. Pode-se inferir que tais linhagens (RMP-354, RMP-572B, RMP-650A, RMP-743 RMP-851, RMP-999, RMP-1333, RMP-1347B e RMP-1478) não produzem biossurfactantes na forma de ácidos graxos, pelo menos não aqueles que podem ser detectados pela metodologia utilizada. Uma outra alternativa seria que estes compostos são muito ativos e que pequenas quantidades (não detectáveis por CG) são suficientes para produzir atividades

tensoativas. Outras metodologias de análise deverão ser aplicadas para identificar a natureza química destes compostos.

Figura 10 - Cromatograma da linhagem RMP-851, representando o comportamento de picos dos primeiro grupo.

O segundo grupo (RMP-296B, RMP-304A1, RMP-344, RMP-753, RMP-810 e RMP-942) apresenta sempre algum tipo de atividade tensoativa e foi possível identificar picos que se encontram por volta dos 17 minutos do tempo de retenção.

Figura 11 - Cromatograma da linhagem RMP-296B, representando o padrão de picos do segundo grupo.

O terceiro grupo de linhagens é representado por aquelas que demonstram algum tipo de atividade tensoativa e que aparecem sempre picos característicos com tempos de retenção de aproximadamente 7, 9.3, 10.3 e 12.6. Entretanto, estes padrões de picos que sempre aparecem nas amostras analisadas, levam a uma outra divisão de 4 subgrupos dentro deste grande grupo. Os quatro subgrupos aqui referidos são fruto da observação destes picos em maiores ou menores intensidades.

O subgrupo “A” compreende as 14 linhagens, que apresentam o pico de 12.6 de grande intensidade, seguidos pelos picos de 9.3 minutos e 7 minutos. Para estas linhagens não aparece ou, quando aparece é em pequena intensidade, o pico de 10 minutos de tempo de retenção. Dentro deste padrão de picos apresentados acima, a linhagem RMP-913A não apresentou nenhuma atividade tensoativa, caracterizando uma exceção.

Figura 12 - cromatograma da linhagem RMP-917, representando o padrão de picos do subgrupo “A”.

O subgrupo “B” compreende as linhagens RMP-292B e RMP-1044 que apresentam picos de aproximadamente 10.1 minutos com grandes intensidades seguidos por picos de 12.6 e os picos de 7 e 9.3 minutos aparecem com intensidades muito baixas.

Figura 13 - Cromatograma da linhagem RMP-292B, representando o padrão de picos do subgrupo “B”.

O subgrupo “C” com as 9 linhagens que possuem em seus cromatogramas todos os picos (7, 9.3, 10.1 e 12.6 minutos) em grandes intensidades, porém somente a linhagem RMP-535A2 apresentou atividade tensoativa pela formação de emulsão em microtubos e em tubos de vidro, com E24 igual a 4. As linhagens RMP-317B1 e RMP-317B2, apesar de apresentarem o mesmo padrão de picos que as outras linhagens do grupo, não apresentaram propriedades tensoativas. .

Figura 14 - Cromatograma da linhagem RMP-317B2, representando o padrão de picos do subgrupo “C”.

O subgrupo “D” possui 12 linhagens que possuem algum tipo de atividade tensoativa comprovada e que possuem um padrão de picos em seus cromatogramas bastante semelhante entre si. Possuem picos de 7 e 9.3 minutos com grandes intensidades e os picos de 10.1 minutos e 12.6 minutos aparecem em poucas linhagens e mesmo quando aparecem é em intensidades muito pequenas. Somente as linhagens RMP-550B e RMP-896 apresentaram os mesmos padrões de picos e nenhuma atividade tensoativa foi observada.

Figura 15 - Cromatograma da linhagem RMP-297, representando o padrão de picos do subgrupo “D”.

Uma vez que algumas linhagens que não apresentam atividades tensoativas apresentam padrões de picos semelhantes a outras linhagens positivas quanto às atividades tensoativas, pode-se inferir que estes componentes correspondentes a estes picos não estão claramente vinculados a tais atividades. Entretanto, considerando que alguns compostos podem interagir (seja sinergisticamente, seja antagonisticamente), talvez estes compostos poderiam estar associados às propriedades tensoativas detectadas.

Com o objetivos de caracterizar melhor os compostos associados aos picos cromatográficos em questão e dessa forma estabelecer uma correlação entre sua composição química é possíveis propriedades tensoativas, as linhagens RMP- 292B, RMP-297, RMP-506C2, RMP-718b e RMP810 forma selecionadas para novos cultivos que permitissem uma melhor caracterização dos tensoativos produzidos.

Tabela 7 - Correlação das linhagens com a porcentagem da área dos picos nos cromatogramas e os testes para verificar propriedades tensoativas.

Grupos	Linhagem bacteriana	Picos demonstrados nos cromatogramas						Colapso da gota	E24
		Composição (área%)							
		7	9.3	10.1	12.6	17.2	17.5		
1°	RMP-354	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	+
	RMP-572B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	-
	RMP-650A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	+
	RMP-851	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	7
	RMP-743	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	-
	RMP-999	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	-
	RMP-1333	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	+
	RMP-1347	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+	+
	RMP-1478	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	9
2 °	RMP-296B	0,00	0,00	0,00	0,00	64,46	35,54	+	+
	RMP304A1	0,00	0,00	0,00	0,00	64,15	35,85	-	+
	RMP-344	6,60	0,00	0,00	0,00	59,82	33,58	+	4
	RMP-753	0,00	0,00	0,00	0,00	74,85	25,15	+	-
	RMP-810	6,59	0,00	0,00	0,00	59,93	33,49	+	+
	RMP-942	23,91	0,00	0,00	0,00	49,01	27,08	-	47
3° Sub “A”	RMP-292C	3,92	3,32	0,00	92,76	0,00	0,00	-	+
	RMP-311	28,09	30,23	0,00	29,02	8,73	3,93	+	7
	RMP-483A	39,01	3,57	0,00	53,81	0,00	3,61	-	6
	RMP-483B	33,89	31,30	0,00	34,82	0,00	0,00	+	-
	RMP506C1	16,50	12,41	0,00	71,09	0,00	0,00	+	8
	RMP506C2	31,40	33,95	1,51	33,14	0,00	0,00	+	5
	RMP-636	23,32	27,78	0,46	48,44	0,00	0,00	-	+
	RMP-718B	28,99	33,17	0,00	37,84	0,00	0,00	-	4
	RMP-913A	3,17	7,80	5,36	68,32	15,35	0,00	-	-
	RMP-917	15,41	17,11	0,00	67,48	0,00	0,00	+	3
	RMP-1077	15,18	16,71	0,00	68,10	0,00	0,00	+	-
	RMP-1108	18,54	19,55	0,00	34,76	17,43	9,72	+	17
	RMP-1116	10,09	8,32	16,79	41,08	13,96	9,77	+	10
	RMP-1334	12,33	12,07	0,00	50,71	0,00	24,89	+	7
3° Sub“B”	RMP-292B	1,08	0,89	84,17	13,86	0,00	0,00	+	+
	RMP-1044	6,96	4,97	67,33	20,75	0,00	0,00	+	4
3° Sub “C’	RMP317B1	39,13	30,43	12,83	17,61	0,00	0,00	-	-
	RMP317B2	39,92	33,58	18,93	7,58	0,00	0,00	-	-
	RMP481A	34,76	27,77	12,77	24,70	0,00	0,00	+	+
	RMP-520	35,51	33,72	6,47	5,25	12,16	6,89	+	10
	RMP-531B	27,46	17,92	10,17	0,00	23,15	21,29	+	2
	RMP535A1	56,76	29,37	9,22	0,81	2,45	1,40	+	-
	RMP535A2	46,40	35,53	7,18	8,56	2,33	0,00	-	4
	RMP-546	40,87	32,43	17,03	0,00	6,00	3,67	+	-
	RMP-753	32,67	32,32	9,16	25,85	0,00	0,00	+	-

(Continua)

Tabela 7 (Continuação)

Grupos	Linhagem bacteriana	Picos demonstrados nos cromatogramas						Colapso da gota	E24
		Composição (área%)							
		7	9.3	10.1	12.6	17.2	17.5		
3º Sub “D”	RMP-062	56,35	43,65	0,00	0,00	0,00	0,00	+	-
	RMP-296A	34,95	36,34	0,17	0,00	18,47	10,07	+	+
	RMP-297	59,31	40,69	0,00	0,00	0,00	0,00	+	7
	RMP-358	51,66	48,34	0,00	0,00	0,00	0,00	+	+
	RMP-481B	53,42	41,31	0,84	0,00	2,87	1,57	+	-
	RMP-536	42,49	34,21	0,00	0,29	14,84	8,17	-	4
	RMP-550B	55,79	44,21	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
	RMP-866	47,61	48,99	0,00	0,00	0,00	3,40	-	4
	RMP-878	46,62	42,40	1,37	0,00	0,00	9,62	+	-
	RMP-886	48,95	49,90	0,65	0,50	0,00	0,00	-	4
	RMP-896	55,10	44,90	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
	RMP-1019	48,27	40,70	4,54	6,50	0,00	0,00	+	3
	RMP-1469	46,05	46,06	7,89	0,00	0,00	0,00	-	30
	RMP-1477	58,34	41,66	0,00	0,00	0,00	0,00	+	-
Conclusão									

Conclusão

4.5 Caracterização de biossurfactantes

No presente ítem serão apresentados os resultados das linhagens selecionadas no ítem anterior com relação à produção de biossurfactantes. Estas linhagens foram cultivadas nas mesmas condições anteriores, porém em volumes maiores (frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de meio de cultura).

Células liofilizadas foram utilizadas para análise de PHA e o sobrenadante foi utilizado para as seguintes análises: Colapso da gota, Índice de emulsificação em microtubo e tubo de vidro, medidas de tensão superficial, análises de 3-hidróxiácidos (cromatografia gasosa) e ramnose (cromatografia líquida). Os resultados destes experimentos estão apresentados na **Tabela 8**.

O DNA genômico de todas essas linhagens foi extraído e utilizado para amplificar fragmento correspondente a parte do DNAr 16S. O sequenciamento desses fragmentos revelaram 98-99% de similaridade de todas as linhagens com o gênero *Pseudomonas*.

Tabela 8 - Cultivo de *Pseudomonas* para avaliar a produção de polihidroxialcanoatos e caracterização de biossurfactantes.

Tabela 6. Características dos Polissacarídeos para avaliar a produção de polihidroxialcanoatos e caracterização de biossurfactantes.																	
Linhagem bacteriana	Fonte de carbono	MSC (g/L)	Polihidroxialcanoatos					Biossurfactante									
			Composição (mol%)				PHA (%MSC)	Ramnolipídios				3HA mg/mL	Ram mg/mL	3HA/Ram (mol/mol)	TS* (mN/m)	Colapso da gota	E24
								3HHx	3HO	3HD	3HDd						
RMP292B	Glicose	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	-	55,63	-	30
	O. soja	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	44,73	-	9
RMP297	Glicose	1,68	0,00	0,00	100,00	0,00	5,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	54,13	-	38(INV)
	O. soja	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	43,83	-	3
RMP481B	Glicose	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	60,33	-	-
	O. soja	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	39,73	-	-
RMP483B	Glicose	1,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	49,26	-	14
	O. soja	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	44,60	-	-
RMP506C2	Glicose	1,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	-	53,36	-	49
	O. soja	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	43,06	-	-
RMP718B	Glicose	0,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	55,90	-	49
	O. soja	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	37,93	+	-
RMP810	Glicose	2,71	0,00	0,00	100,00	0,00	2,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	30,53	+	-
	O. soja	3,06	14,25	54,15	31,61	0,00	6,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	41,03	+	5
RMP1315	Glicose	1,36	0,00	0,00	100,00	0,00	6,60	0,00	6,31	65,96	27,73	1,41	0,36	3,40	27,70	+	60
	O. soja	2,33	0,00	45,11	54,89	0,00	7,16	0,00	10,42	73,19	16,39	0,23	0,10	0,82	30,10	+	-
RMP-1481	Glicose	2,43	0,00	21,11	78,89	0,00	24,13	0,00	7,74	84,98	7,28	2,18	0,46	4,52	26,83	+	61
	O. soja	3,30	0,00	28,84	71,16	0,00	44,48	0,00	3,99	88,98	7,03	1,27	0,45	3,10	28,16	+	57
RMP-1489	Glicose	2,21	0,00	0,00	100,00	0,00	1,97	0,00	7,41	80,92	11,67	1,89	0,58	3,66	28,07	+	60(90)
	O. soja	3,99	0,00	34,62	65,38	0,00	2,44	0,00	6,93	81,45	11,61	0,14	0,20	2,22	31,50	+	60

MSC – Massa seca celular 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDD – 3-hidroxidodecanoato 3HA – 3-hidroxialcanoatos detectados no sobrenadante 3HA/Ram – relação 3-hidroxialcanoatos e ramnose detectados no sobrenadante NC – não cresceu TS – Tensão Superficial do sobrenadante da cultura dos microrganismos * Tensão superficial da água 72 mN/m e tensão superficial do meio de cultura 58,18 mN/m (INV) – emulsão formada para o lado do sobrenadante

Os ensaios de biorremediação foram feitos somente com os sobrenadantes das bactérias cultivadas em glicose, pois, em testes preliminares o sobrenadante de algumas culturas em óleo de soja não apresentou resultados positivos de atividades tensoativas. Os resultados estão expressos na **Figura 16**.

Figura 16 - Ensaio de biorremediação com sobrenadantes de isolados contendo prováveis biossurfactantes.

Como esperado, o controle 1 apresentou baixa evolução de CO₂, devido à limitação nutricional (principalmente N e P) em areia de praia. Com a adição de nutrientes (N e P) observou-se um aumento significativo no CO₂ emitido devido à biodegradação do petróleo, como observado no Controle 2. A adição de peróxido de hidrogênio que proporciona um suprimento de O₂ às células levou um aumento maior na taxa de biodegradação (Controle 3). Entretanto, com a adição de ramnolipídio não houve aumento expressivo nas taxas de biodegradação (Controle 4). Todos os sobrenadantes foram testados nas mesmas condições do Controle 3, ou seja, com adição de H₂O₂ e nutrientes (N e P), portanto são comparáveis a este microcosmo.

Os isolados RMP-1315, RMP-1481 e RMP-1489 confirmaram sua capacidade de produzir ramnolipídios, detectados agora não só pela análise de 3-hidroxiácidos como também na análise de ramnose. A relação 3HA/ramnose sugere a produção de mono-ramnolipídio ou mesmo de 3HAA na maioria das condições avaliadas. Apenas a linhagem RMP-1315 quando cultivada em óleo de soja apresentou uma relação

3HA/ram. de 0,82, compatível com a produção de di-ramnolípido. É interessante notar que o sobrenadante de todos estes cultivos foram capazes de promover colapso da gota e reduzir a tensão superficial para valores entre 26,8 e 31,5 mN/m. Com relação ao índice de emulsificação (E24) todas apresentaram valores entre 57 e 61, exceto a linhagem RMP-1315 quando cultivada em óleo de soja. Seria interessante avaliar no futuro se a ausência de capacidade emulsificante está associada ao tipo de ramnolípido produzido.

Nos ensaios de biorremediação, foram observados valores de biodegradação semelhantes aos controles 3 e 4 para as linhagens RMP-1481 e RMP-1489. Para a linhagem RMP-1315 as taxas de biodegradação foram inferiores a estes controles, sugerindo efeitos inibitórios.

Com o objetivo de confirmar a identidade do 3-hidroxidecanoato detectado o sobrenadante dos cultivos da linhagem RMP-1481 com glicose e óleo de soja, após liofilização e propanólise, foram analisados por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa. O espectro de massas do pico correspondente ao 3HD está apresentado na Figura 17. A identidade deste pico pode ser confirmada pela presença do fragmento de m/e 131 característico de popil-ésteres de 3-hidroxiácidos e resultante da alfa-clivagem do grupo funcional hidroxil (Lee & Choi, 1995). O fragmento de m/e 171 corresponde ao fragmento [M-59] característico de um hidróxiácido contendo 10 carbonos.

Figura 17 - Espectro de massas relativo ao propil-éster do ácido 3-hidroxicanônico detectado em ramnolipídios produzido pela linhagem RMP1481.

A linhagem RMP-481B não apresentou nenhuma atividade tensoativa (colapso da gota e E24), não diminuiu a tensão superficial do meio com glicose. Embora tenha se observado um valor de tensão superficial de 39,73 mN/m, essa redução pode ser associada à adição de óleo de soja no meio de cultura e por conseguinte à liberação dos ácidos graxos devido à hidrólise do óleo. Também não foi observada nenhuma produção de PHA ou ramnolipídio em análises de CG. O ensaio de biorremediação com o sobrenadante desta linhagem apresentou evolução de CO_2 menor que a situação controle, indicando um efeito inibitório.

As linhagens RMP-292B, RMP297, RMP-483B, RMP- 506C2, RMP-718B e RMP-810 quando cultivadas em óleo de soja apresentaram valores semelhantes de tensão superficial do sobrenadante (por volta de 40 mN/m). Para algumas dessas linhagens não foi observada qualquer atividade tensoativa (RMP-483B e RMP-506C2), para as demais linhagens alguma atividade tensoativa foi observada (colapso da gota ou E24).

O pico característico observado nos cultivos com óleo de soja e que poderia estar associado à propriedades tensoativas era aquele detectado com tempo de retenção por volta de 24,9 minutos. A amostra do sobrenadante do cultivos da linhagem RMP-718B cultivada em óleo de soja, após liofilização e propanólise, foi

submetida à análise de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa. A comparação dos fragmentos obtidos no espectro de massa relativos ao pico com 24,9 minutos a uma biblioteca de padrões, identificou esse espectro como correspondente ao propil-éster do ácido dodecanóico (**Figura 18**). Este ácido, em cultivos com óleo de soja, provavelmente resulta da degradação de ácidos graxos presentes no óleo vegetal. Embora existam relatos de atividades tensoativas para ácidos graxos (Desai e Banat, 1997), para a confirmação de que as propriedades tensoativas observadas anteriormente correspondem a este composto, serão necessários estudos adicionais.

Figura 18 - Espectro de massas relativo ao propil-éster do ácido decanóico detectado em cultivos utilizando óleo de soja como fonte de carbono.

Nos cultivos utilizando glicose como fonte de carbono sempre foi observada alguma atividade tensoativa para as linhagens RMP-292B, RMP297, RMP-483B, RMP- 505C2, RMP-718B e RMP-810, embora a tensão superficial do sobrenadante não apresentou redução significativa para a maioria delas. Apenas para a linhagem RMP-810 observou-se uma redução significativa na tensão superficial do meio de cultura, que atingiu 30,53 mN/m, ou seja, valor semelhante àquele observado para isolados produtores de ramnolipídios.

Com relação à biorremediação de petróleo, apenas as linhagens RMP-718B e RMP810 apresentaram taxas de biodegradação semelhantes ao controle, as demais apresentaram valores menores indicando efeitos inibitórios.

Nos cultivos com glicose como fonte de carbono, foram verificados 6 picos (tempos de retenção de 7; 9,3; 10,1; 12,6; 17,2 e 17,5 minutos) aos quais poderiam ser associadas as atividades tensoativas. A fim de identificar a composição química desses picos, os sobrenadantes dos cultivos das linhagens RMP-292B, RMP-297, RMP718B e RMP810, após liofilização e propanólise, foram submetidos à cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa.

A **Figura 19** apresenta os espectros de massa para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção de 7 minutos obtidos com dois isolados (RMP297 e RMP718B). Uma vez que o mesmo padrão de fragmentos é observado, os picos devem corresponder ao mesmo composto. A análise em biblioteca de espectros de massa identifica estes fragmentos como equivalentes àqueles esperados para o composto 3,3-dimetiloxiranil ($C_6H_{10}O_2$). Uma busca na literatura não permitiu identificar qualquer trabalho que associe a produção deste composto a linhagens de *Pseudomonas* ou a atividades tensoativas. Assim, permanece a dúvida se a identificação com base no espectro de massas foi adequada ou mesmo se as atividades tensoativas podem ser associadas a este composto.

Figura 19 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 7,0 minutos. A. isolado RMP 297 e B. isolado RMP718B.

A **Figura 20** apresenta os espectros de massa para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção de 9,3 minutos obtidos com dois isolados (RMP297 e RMP718B). Uma vez que o mesmo padrão de fragmentos é observado, os picos devem corresponder ao mesmo composto. A análise em biblioteca de espectros de massa identifica estes fragmentos como equivalentes àqueles esperados para o composto 3-octin-2-ona ($C_8H_{12}O$). Uma busca na literatura também não permitiu identificar qualquer trabalho que associe a produção deste composto a linhagens de

Pseudomonas ou a atividades tensoativas. Assim, novamente, permanece a dúvida se a identificação com base no espectro de massas foi adequada ou mesmo se as atividades tensoativas podem ser associadas a este composto.

Figura 20 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 9,3 minutos. A. isolado RMP 297 e B. isolado RMP718B.

A **Figura 21** apresenta o espectro de massa para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção de 10,1 minutos obtido a partir do isolado RMP810. A análise em biblioteca de espectros de massa identificou estes como equivalentes àqueles esperados para o composto 2-acetilfurano. Buscas na literatura não permitiu

identificar qualquer trabalho que associe a produção deste composto a linhagens de *Pseudomonas* ou a atividades tensoativas. Pelo menos dois trabalhos (Ash, *et al.*, 1979; Bailey, *et al.*, 1994), associam compostos contendo um radical 2-acetilfurano com atividade antiviral. A atividade antiviral atribuída em um desses trabalhos corresponde à incapacidade de adsorção do vírus. Entretanto, não foi elucidado se essa características desses compostos pode ser associadas à propriedades tensoativas.

Uma vez que a linhagem RMP810 foi a que apresentou atividades tensoativas muito claras (tensão superficial reduzida para valores próximos a 30 mN/m e colapso da gota), desperta grande interesse a identificação da substância produzida por essa linhagem.

Figura 21 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 10,1 minutos obtido com o isolado RMP810.

A **Figura 22** apresenta o espectro de massa para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção de 17,2 minutos obtido com o isolado RMP292B. A análise em biblioteca de espectros de massa identifica estes fragmentos como equivalentes àqueles esperados para o ácido oleico (ácido 9-octadecenoico). O ácido oléico é um componente comum em triglicérides produzidos por plantas e mesmo por alguns microrganismos (Alvarez, *et al.*, 2006). Entretanto, não foram identificados relatos sobre a produção de triglicérides por *Pseudomonas*. Uma vez que se comprove

a produção desse composto por *Pseudomonas*, será importante verificar se é o responsável pelas propriedades tensoativas observadas.

Figura 22 - Espectro de massas para o composto equivalente ao pico com tempo de retenção 17,2 minutos obtido com o isolado RMP292B.

Não foi possível obter espectros de massa para os compostos relativos aos picos com tempo de retenção de 12,6 e 17,5 minutos, pois em todas as amostras a quantidade obtida nestes experimentos foi muito menor do que aquelas verificadas nos experimentos anteriores.

Em resumo, a análise por espectrometria de massa de picos equivalentes a compostos que supostamente poderiam estar associados às atividades tensoativas ainda não permitiu uma análise conclusiva. A análise por espectrometria de massa indicou compostos aos quais não foi possível associar atividades tensoativas. Assim, ou estamos diante de compostos que possuem atividades tensoativas não detectadas anteriormente, ou as atividades tensoativas podem estar associadas a outros compostos. Nesse último caso, estudos futuros utilizando outras metodologias analíticas deverão ser realizados para identificar esses compostos.

5 CONCLUSÃO

- Foram padronizadas novas metodologias efetivas para a seleção de bactérias produtoras de biossurfactantes.
- Foram isoladas 1713 linhagens, as quais 944 foram capazes de crescer em meio PIA, podendo ser caracterizadas como prováveis bactérias do gênero *Pseudomonas*. Logo, obteve-se acesso a uma grande diversidade de microrganismos.
- Foram obtidas 240 linhagens positivas em colapso da gota e 99 positivas em meio SW. Estes métodos de seleção são complementares, já que um não exclui ao outro na capacidade de detecção de produção de compostos bioativos.
- Foram selecionados 112 isolados para realização dos testes de produção de biossurfactantes e polihidroxialcanoatos. Foi possível selecionar 31 linhagens de prováveis produtoras de ramnolipídios e 56 linhagens de produtoras de biossurfactantes com características diferentes de ramnolipídios.
- A análise da composição do ramnolipídio produzido a partir de glicose ou óleo de soja sugere que diferentes vias do metabolismo de ácidos graxos contribuem com 3-hidroxiácidos para biossíntese de ramnolipídio.
- Selecionou-se 10 linhagens que foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* através de seqüenciamento de fragmento correspondente a parte do DNAr 16S das mesmas. Foi confirmada a produção de ramnolipídios por 3 destas linhagens, através de análises de CG e HPLC para verificação de ácidos graxos e ramnose produzidos.
- Pode-se constatar que a linhagem RMP-810 possui produção de compostos tensoativos diferentes de ramnolipídios e através de análises de CG-MS foi encontrado o 2-acetilfurano produzido por esta linhagem. Tal composto não é mencionado na literatura como biossurfactante, nem como produto do metabolismo de *Pseudomonas*, podendo ser um novo composto promissor e que deverá ser melhor investigado e caracterizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.* 2001; 67: 5233-9.

Al-Tahhan RA, Sandrin TR, Bodour AA, Maier MA. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(8): 3262-8.

Amezcu-Vega C, Ferrera-Cerrato R, Esparza-Garcia F, Rios-Leal E, Rodriguez-Vazquez R. Effect of combined nutrients on biosurfactant produced by *Pseudomonas putida*. *J Environ Sci Health A-Toxic Hazard Subst Environ Eng.* 2004; 39:2983 - 91.

Anzai Y, Kodo Y, Oyaizu H. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47: 249-51.

Anzai Y, Kim H, Park Ju-Y, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Sys Evol Microbiol.* 2000; 50: 1563-89.

Arino S, Marchal R, Vandecasteele JP. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J Appl Microbiol.* 1998; 84:769-76.

Ash M, Ash I. Handbook of industrial surfactants. VT: Gower Publishing Company; 1993.

Ash R, Parker RA, Hagan AC, Mayer GD. RMI 15,731 (1[5-Tetradecyloxy-2-furanyl]-ethanone), a new antirhinovirus compound. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 16(3): 301-5.

Atkinson T, Sherwood R. *Pseudomonas*. *Biotechnology Handbooks* 10, In: Montie T. C, editor. New York: Plenum Press; 1998.

Azevedo CMA. Bioprospecção: coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Caderno No 17; 2003.

Balibar CJ, Vaillancourt FH, Walsh CT. Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem. Biol.* 2005; 12:1189-200.

Ballio A, Bossa F, Di Giorgio D, Ferranti P, Paci M, Pucci P, Scaloni A, Segre A, Strobel GA. Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: the pseudomyces. *FEBS Lett.* 1994; 355: 96-100.

Banat MI. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresour Technol.* 1995; 51: 1-12.

Banat MI, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000; 53: 495-508.

Beal RB, Betts WB. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2000 89:158 -68.

Becher P. Emulsions, Theory and Practice. 2. ed. New York: Reinhold Publishing; 1965.

Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999; 63:266-92.

Bender CL, Scholz-Schroeder BK. New insights into the biosynthesis, mode of action, and regulation of syringomycin, syringopeptin, and coronatine. In: *Pseudomonas. Virulence and Gene Regulation*. New York Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004. Vol. 2; p. 125-58.

Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, Manresa A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Ant Van Leeuw.* 2004. 85:1-8.

Bento FM, Camargo FAD, Okeke BC, Frankenberger WT. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol Res.* 2005; 160:249 - 55.

Bergström S, Theorell H, Davide H. On a metabolic product of *P. pyocyanea*, pyolipidic acid, active against *Mycobacter tuberculosis*. *Ark Kem Mineral Geol.* 1946; 23(A):1-12.

Bicca FC, Fleck C, Ayub MAZ. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. Rev Microbiol. 1999;30:231-6.

Bierman M, Lange F, Piore R, Ploog U, Rutzen H, Schindler J, Schmidt R. In: Falbe, J, editor. Surfactants in Consumer Products, Theory, Technology and Application. Heidelberg: Springer-Verlag; 1987.

Bondour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. J Microbiol Methods. 1998; 32: 273-80.

Bondour AA, Drees KP, Maier RM. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:3280-7.

Bonilla M, Olivaro C, Vazquez A, Soubes M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. J Appl Microbiol. 2005; 98: 456-63.

Bloomberg G. Designing proteins and emulsifiers. Lebensmitteltechnologies. 1999; 24:130-1.

Braun PG, Hildebrand PD, Ellis TC, Kobayashi DY. Evidence and characterization of a gene cluster required for the production of viscosin, a lipopeptide biosurfactant, by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. Can J Microbiol. 2001; 47:294-301.

Brock. Microbiologia de Brock. 10. ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall; 2005. Cd-Rom; Cap. 18.

Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and Discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(3): 573-606.

Burd G, Ward OP. Energy-dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. Can J Microbiol. 1997; 43:391-394.

Burger MM, Glaser L, Burton RM. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem. 1963; 238: 2595-601.

Cameotra SS, Makkar RS. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. Curr Opin Microbiol. 2004; 7:262-6.

Campos-Garcia J, Caro AC, Nájera R, Miller-Maier RM, Al-Tahhan RA, Soberón-Chávez G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. J Bacteriol. 1998; 180(17): 4442-51.

Canhos VP, Manfio GP. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Diretrizes e estratégias do Fundo Setorial de Biotecnologia. Comitê Gestor do Fundo Setorial de Biotecnologia, Centro de Referência em Informação Ambiental. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia; 2002.

Carpaneto A, Serra MD, Menestrina FGV, Gambale F. The phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae* pv *syringae* forms ion channels in sugar beet vacuoles. J Membr Biol. 2002;188:237-48.

Cha M, Lee N, Kim M, Kim M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. Biores Technol. 2008; 99(7): 2192-9.

Chakrabarty AM. Genetically-manipulated microorganisms and their products in the oil service industries. Trends Biotechnol. 1985; 3:32-8.

Chayabutra C, Wu J, Ju L. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* Under Denitrification: Effects of Limiting Nutrients and Carbon Substrates. Biotech Bioeng. 2001; 72:25-33.

Chayabutra C, Ju LK. Polyhydroxyalkanoic Acids and Rhamnolipids Are Synthesized Sequentially in Hexadecane Fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Biotechnol Prog. 2001; 17: 419-23.

Chen C, Baker SC, Darton RC. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. J Microbiol Methods. 2007; 70(3): 503-10.

Coelho J, Rivonkar CU, Bhavesh NS, Jothi M, Sangodkar UMX. Biosurfactants production by the quinoline degrading marine bacterium *Pseudomonas* sp strain GU 104, and its effect on the metabolism of green mussel *Perna viridis* L. Ind J Mar Sci. 2003; 32: 202 - 7.

Coiro VM, Segre AL, Di Nola A, Paci M, Grottesi A, Veglia G, Ballio A. Solution conformation of the *Pseudomonas syringae* MSU 16H phytotoxic lipodepsipeptide Pseudomycin A determined by computer simulations using distance geometry and molecular dynamics from NMR data. Eur J Biochem. 1998; 257: 449-56.

- Colwell R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1997;18(5):302-7.
- Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53:224-9.
- Cooper DG, Eccles ERA, Sheppard JD. The effect of surfactants on peat dewatering. *Can J Chem Eng*. 1988;66: 393-7.
- Cooper DG, Pillon DW, Mulligan CN, Sheppard JD. Biological additives for improved mechanical dewatering of fuel-grade peat. *Fuel*. 1986;65:255-9.
- Cornelis P, editor. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister:Academic Press; 2008.
- Costa SGVAO, Nitscheke M, Haddad R, Eberlin MN, Contiero J. Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol Pro*. 2006; 41: 483-8.
- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997, 61(1): 47-64.
- Desai JD, Desai AJ. Production of biosurfactants. In: Kosaric N, editor. *Biosurfactants: production, properties, applications*. New York: Marcel Dekker; 1993. p.....-.....
- De Andrés C, Mercadé E, Guinea J, Manresa A. 7,10-Dihydroxy-8(E)-Octadecenoic Acid Produced by *Pseudomonas*-42A2: Evaluation of Different Cultural Parameters of the Fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 1994; 10:106-9.
- Dedeurwaerdere T. Bioprospection: From the Economics of Contracts to Reflexive Governance. The Fondazione Eni Enrico Mattei Note di Lavoro Series Index [serial on the internet]. 2004 [cited 2008 Sept 01]. <http://www.feem.it/Feem/Pub/Publications/WPapers/default.htm>
- Dehghan-Noudeh G, Housaindokht M, Bazzaz BSF. Isolation, Characterization, and Investigation of Surface and Hemolytic Activities of a Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *J Microbiol*. 2005; 43: 272 - 276.
- Deleu M, Paquot M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *C R Chim*. 2004; 7: 641-6.

Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R. *rhIA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* Ç 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*. 2003; 149: 2005-13.

Dubern JF, Lagendijk EL, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J Bacteriol*. 2005; 187: 5967-76.

Dubern JF, Coppoolse ER, Stiekema WJ, Bloemberg GV. Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvim I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL 1445. *Microbiology*. 2008; 154: 2070 - 83.

Franklin RBM, Mills AL. Structural and Functional Responses of a Sewage Microbial Community to Dilution-Induced Reductions in Diversity. *Microb Ecol*. 2006. 52: 280-8.

Galli E, Barbieri P, Beltrametti F, Bertoni GB, Bolognese G, Gennaro OP, Zennaro E. Alternative pathways for biodegradation of alkyl and alkylbenzenes. In: Nakazawa T, Furukawa K, Haas D, Silver S, editors. *Molecular Biology of Pseudomonads*. Washington DC: ASM Press; 1996. p. 48-57.

Gewolb J. Bioengineering: Working outside the protein-synthesis rules. *Science*. 2002; 295: 2205-07.

Giane C, Wullbrandt D, Rothert R, Meiwes J, inventors. *Pseudomonas aeruginosa* and its use in process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. United States patent US 5658793.1997.

Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Bueno Netto CL, Oliveira MS, Silva LF. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996; 45: 785-91.

Guenzi E, Galli G, Grgurina I, Gross DC, Grandi G. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem*. 1998; 273: 32857-63.

Guerra-Santos L, Käppeli O, Fiechter A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60(2):301-5.

Guillén MD, Ibargoitia ML. GC/MS analysis of lignin monomers, dimers and trimers in liquid smoke flavourings. *J Sci Food Agric*. 1999; 79: 1889-903.

Ghurye GL, Vipulanandan C, Willson RC. A practical approach to biosurfactant production using non-aseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol Bioeng* 1994; 44: 661-6.

Gunther NW, Nuñez A, Fett W, Solaiman DKY. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2288-93.

Haba E, Espuny MJ, Busquets M, Manresa A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J Appl Microbiol*, 2000; 88:379-87.

Haba E, Abalos A, Jauregui O, Espuny MJ, Manresa A. Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition anproperties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Surfactants Deterg*. 2003; 6: 155-61.

Hammond Prenome. The current magnitude of biodiversity. In: Heywood, editor. *Global Biodiversity Assessement*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 113-38.

Harvey S, Elashvili I, Valdes JJ, Kamely D, Chakrabarty MA. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biotechnology*. 1990; 8: 228-30.

Harrison L, Teplow DB, Rinaldi M, Strobel G. Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *J Gen Microbiol*. 1991; 137(12): 2857-65.

Henriksen A, Anthoni U, Nielsen TH, Sorensen J, Christophersen C, Gajhede M. Cyclic lipoundecapeptide tensin from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Cry Struct Communicate*. 2002; 56:113-5.

Hernandez-Anguiano AM, Suslow TV, Leloup L, Kado CI. Biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* and soft-rotting of harvested florets of broccoli and cauliflower. *Plant Pathol*. 2004; 53: 596-601.

Hester A. IB Market forecast. *Indust Bioprocess*. 2001; 23: 3.

Heyd M, Kohnert A, Tan TH, Nusser M, Kirschhöfer F, Brenner-Weiss G, Franzreb M, Berensmeier S. Development and trends of biosurfactant analysisand purification using rhamnolipids as an example. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 391:1579-90.

- Hjertén S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins on neutral adsorbents. *Methods Prot Separat.* 1976; 2: 233-43.
- Hori, K., Marsudi, S. and Unno, H. Simultaneous production of polyhydroxialcanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol Bioengineer.* 2002;78 (6): 699-707.
- Hunter-Cevera, The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1:278-85.
- Ishigami Y, Suzuki S. Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes. *Prog Org Coat.* 1997; 31: 51-61.
- Jarvis FG, Johnson MJ. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc.* 1949; 71: 4124-6.
- Kitamoto D, Yanagishita H, Shinbo T, Nakane T, Kamisawa C, Nakahara T. Surface-active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J Biotechnol.* 1993; 29: 91-6.
- Koch AK, Käppeli O, Fiechter A, Reiser J. Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa* Mutants. *J Bacteriol.* 1991; 173 (13): 4212-19.
- Klekner V, Kosaric N. Biosurfactants for cosmetics. In: N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1993. 329-72.
- Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GEM, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol.* 2004; 51: 97-113.
- Lang S, Katsiwela E, Wagner F. Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Sci Technol.* 1989; 91: 363-6.
- Lang S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr Opin Coll Interf Sci.* 2002; 7:12-20.
- Lang S, Wullbrandt D. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999; 51: 22-32.

- Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 581-93.
- Lee SY, Choi JI, Chang HN. Process development and economic evaluation for the production of polyhydroxyalkanoates by *Alcaligenes eutrophus*. In: Eggink, G.; Steinbüchel, A.; Poirier, Y. & Witholt, B. (eds) 1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, 127-136, 1997. NRC Research Press - Ottawa.
- Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Functional Analysis of A pyoverdine Synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71(8): 2002–9.
- Maier RM, Soberón-Chávez G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000; 54: 625–633.
- Martinez-Toledo A, Rios-Leal E, Vazquez-Duhalt R, Gonzalez-Chavez MD, Esparza-Garcia JF, Rodriguez-Vazquez R. Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. *Environ Technol.* 2006; 27:137–42.
- Marsudi S, Unno H, Hori K. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 78: 955–61.
- Matsuyama T, Sogawa M, Yano I. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 53: 1186 - 8.
- Medina G, Juarez K, Valderrama B, Soberón-Chávez G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR Transcriptional Regulation of the rhlAB Promoter. *J Bacteriol.* 2003; 185: 5976–83.
- Miller DJ, Zang YM, Rock CO, White SW. Structure of RhlG, an Essential β -Ketoacyl Reductase in the Rhamnolipid Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 2006; 281(26): 18025–32.
- Mills DEK, Entry J.A, Voss JD, Gillevet PM, Mathee K. An assessment of the hypervariable domains of the 16S rRNA genes for their value in determining microbial community diversity: the paradox of traditional ecological indices. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006; 57: 496–503.
- Moldes AB, Torrado AM, Barral MT, Domínguez JM. Evaluation of Biosurfactant Production from Various Agricultural Residues by *Lactobacillus pentosus*. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 4481 - 6.

Monti SM, Gallo M, Ferracane R, Borrelli RC, Ritieni A, Greco ML, Graniti A, Fogliano V. Analysis of bacterial lipodepsipeptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight and high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. *Rap Commun Mass Spectrometry*. 2001; 15: 623–8.

Mulligan CN. Environmental applications for biosurfactants. *Environ Poll*. 2005; 133: 183 - 98.

Mulligan CN, Gibbs BF. Factors influencing the economics of biosurfactants. In N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p. 329–371, 1993.

Myers. Environmental services of biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93(7): 2764-2769, 1996. NSF 1997. NSF Workshop on Systematics and Inventory of Soil Nematodes, Julho 1997. <http://www.nrel.colostate.edu/soil/sisn.html>.

Neu TR. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev*. 1996; 60: 151–66.

Nielsen TH, Christophersen C, Anthoni U, Sorensen J. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J Appl Microbiol*. 1999; 86: 80–90.

Nielsen TH, Sorensen D, Tobiasen C, Andersen JB, Christophersen C, Givskov M, Sorensen J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68: 3416 - 23.

Nielsen TH, Thrane C, Christophersen C, Anthoni U, Sorensen J. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J Appl Microbiol*. 2000; 89: 992–1001.

Nielsen TH, Nybroe O, Koch B, Hansen M, Sorensen J. Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(7): 4112–6.

Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J. Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules. *Biotechnol Pro*. 2005; 21: 1593-1600.

Noordman WH, Wachter JHJ, De Boer GJ, Janssen DB. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. J Biotechnol. 2002; 94:195–212.

Nybroe O, Sorensen J. Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads. in: Pseudomonas, Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism. J.-L. Ramos, ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, U.S.A., 2004. p. 147-172.

O'May GA, Allison DG, Gilbert P. A rapid method for the evaluation of both extrinsic and intrinsic contamination and resulting spoilage of water-in-oil emulsions. J Appl Microbiol. 2004; 96: 1124–32.

O'Connor L. Market forecast: microbial biosurfactants. Ind Bioprocess. 2002; 24: 10-11.

O'Sullivan DJ, O'Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* sp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol Rev. 1992; 56: 662–76.

Ochsner UA, Kock AK, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1994; 176: 2044–54.

Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J Biol Chem. 1994; 269: 19787–95.

Ochsner UA, Reiser J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci. 1995; 92: 6424–28.

Olvera C, Goldberg JB, Sanchez R, Soberon-Chavez G. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. FEMS Microbiol Lett. 1999; 179: 85–90.

Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl Microbiol Biotechnol. 1999; 51: 553–63.

Pelczar Jr, Chan ECS, Krieg NR. Microbiology – Concepts and Applications. McGraw Hill – New York, 1993; 896.

Phale PS, Savithri HS, Rao NA, Vaidyanathan CS. Production of Biosurfactant Biosur-Pm by *Pseudomonas-maltophilia* Csv89 - Characterization and Role in Hydrocarbon Uptake. Arch Microbiol. 1995; 163: 424–31.

Prieto LM, Michelon M, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. *Chemosp.* 2008; 71(9): 1781–5.

Pruthi V, Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnol Tech.* 1997; 11 (9): 671–4.

Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology | *Pseudomonas* book. Publisher: Caister Academic. Press Editor: Pierre Cornelis Vrije Universiteit Brussel, Belgium. Publication date: January 2008. ISBN: 978-1-904455-19-6

Raaijmakers JM, Buijin I, Kock JD. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Ame Phytopatology Soc.* 2006; 19(7): 699–710.

Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dube B, Batille P, Ramsay JA. Production of poly- β -hydroxybutyric- β -hydroxyvaleric acids. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56: 2093–8.

Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberón-Chávez, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhIC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol.* 2001. 40: 708–18.

Rehm BHA, Mitsky TA, Steinbüchel A. Role of fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by *Pseudomonads*: Establishment of the Transacyclase (PhaG)- Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7): 3102–9.

Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J Chrom.* 1988; 445: 285–9.

Risse D, Beiderbeck H, Taraz K, Budzikiewicz H, Gustine D. Bacterial constituents part LXXVII. Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A. J Biosci.* 1998; 53: 295–304.

Roongsawang N, Hase K, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp MIS38. *Chem Biol.* 2003; 10: 869–80.

Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999; 52: 154–162.

Rosemberg M. Bacterial Adherence to Polystyrene: a Replica Method of Screening for Bacterial Hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol.* 1981; 42(2): 375-7.

Santos AS, Sampaio APW, Vasquez GS, Santa Anna LM, JR NP, Freire DMG. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* Grown in Residual Soybean Oil. *Appl Biochem Biotechnol.* 2002; 98: 1025–34.

Schimel. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. *Ecol Stud.* 1995; 113: 239–54.

Schmitt TM. Analysis of surfactants. New York: Marcel Dekker; 2001.

Schroth MN, Hildebrand DC Panopulos N. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads, In: A. Balows, H. G., Trüper, M., Dworkin, W. Harder, & H. Schliefer (ed.), *The prokaryotes*. Springer- Verlag, Berlin, Germany, 1991; 3104-3131.

Sieber SA, Marahiel MA. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem Rev.* 2005; 105: 715–38.

Siegmund I, Wagner F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Tech.* 1991; 5(4): 265–8 .

Silva RN, Monteiro VN, Alcanfor JDX, Assis EM, Asquieri ER. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência Tecnol Alim.* 2003; 23(3): 337–41.

Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv.* 2007; 25: 99–121.

Smyth CJ, Jonsson P, Olsson E, Soderlind O, Rosengren J, Hjerten S, Wadstrom T. Differences in Hydrophobic Surface Characteristics of Porcine Enteropathogenic *Escherichia coli* With or Without K88 Antigen as Revealed by Hydrophobic Interaction Chromatography. *Inf Imm.* 1978; 22: 462–472.

Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramirez M. Is *Pseudomonas aeruginosa* Only “Sensing Quorum”? *Crit Rev Microbiol.* 2005; 31(3): 171-82.

Soberón-Chávez G, Lepine F, Déziel E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 68: 718–25.

- Soetaert WV, Vandamme E. The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol J*. 2006; 1: 756–69.
- Sorensen D, Nielsen TH, Christophersen C, Sorensen J, Gajhede M. Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. *Cryst. Struct. Commun*. 2001; 57: 1123–1124.
- Spiekermann P, Rehm BHA, Kalsheuer R, Baumeister D, Steinbüchel A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol*. 1999; 171: 73–80.
- Strelec T. Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídios e polihidroxicanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP-IPT-I. Butantan. 81 p. 2006.
- Stanghelini ME, Miller RM. Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. *Plant Dis*. 1997; 81: 4-12.
- Stanghelini ME, Miller RM, Rasmussen SL, Kim DH, Zhang Y. 1998. US 5,767,090. Staley, J. Microbial Divers Bios, 1998. <http://www.bdt.org.br/oea/sib/staley>.
- Sundari RBT, Sandhya S. Extracellular Microbial Lipids from *Pseudomonas* S(P) Ls(1) As Bioemulsifiers. *Journal of Environmental Science and Health Part A. Environ Sci Eng Toxic Hazard Sub Com*. 1995; 30:171-82.
- Swisher RD. Surfactant biodegradation. New York: Marcel Dekker; 1987.
- Thanomsub B, Watcharachaipong T, Chotelersak K, Arunrattiyakorn P, Nitoda T, Kanzaki H. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J Appl Microbiol*. 2004. 96: 588–92.
- Therisod M, Klibanov AM. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J Am Chem Soc*. 1986; 108: 5638–40.
- Toren A, Navon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberg E. Emulsifying activities of purified alasanproteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 1102–6.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Testes para orientar a quimioterapia. *Microbiologia*. 6ª Edição. Artemed, Porto Alegre; 2000.

Ueno Y, Hitashima N, Inoh Y, Furuno T, Nakanishi M. Characterization of Biosurfactant-Containing Liposomes and Their Efficiency for Gene Transfection. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30:169–72.

Ui H, Miyake T, Iinuma H, Imoto M, Naganawa H, Hattori S, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa S, Umezawa K. Pholipeptin, a Novel Cyclic Lipoundecapeptide from *Pseudomonas fluorescents*. *J Org Chem.* 1997; 62: 103–8.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv.* 2006; 26: 604–20.

Van Hoogmoed CG, Dijkstra RJB, Van der Mei HC, Busscher H.J. Influence of Biosurfactant on Interactive Forces between Mutans Streptococci and Enamel Measured by Atomic Force Microscopy. *J Dent Res.* 2006; 85: 54–8.

Wei YH, Choub CL, Changb JS. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem Eng J.* 2005; 27:146–54.

Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol. Meth.* 2004; 56: 339–47.

Wattanaphon HT, Kerdsin A, Thammacharoen C, Sangvanich P, Vangnai AS. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. *J Appl Microbiol.* 2008; 105(2): 416–23.

Wild M, Caro AD, Hernandez AL, Miller RM, Soberon-Chavez G. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol Lett.* 1997. 153: 279–85.

Willis DK, Kinscherf TG. Global regulation in *Pseudomonas syringae*. In: *Pseudomonas* Vol. 2, Virulence and Gene Regulation. J.-L. Ramos, ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, U.S.A. p. 223-238; 2004.

Wubbolts MG, Witholt B. Selected industrial biotransformations. In: Atkinsons. T., Sherwood RF (eds). *Biotechnology Handbooks 10 – Pseudomonas*. Plenum Press – New York and London. , 1998; p. 271-329.

Youssef NH, Duncan KE, McInerney MJ. Importance of 3-Hydroxy Fatty Acid Composition of Lipopeptides for Biosurfactant Activity. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:7690–5.

Zhu K, Rock CO. RhIA 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. 2008; 190(9): 3147–54.