

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARQUIMEDES PAIXÃO DE SANTANA FILHO

**RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614:
ESTUDOS DE PRODUÇÃO E DE VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE
HOMÓLOGOS**

**CURITIBA
2009**

ARQUIMEDES PAIXÃO DE SANTANA FILHO

**RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614:
ESTUDOS DE PRODUÇÃO E DE VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE
HOMÓLOGOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências -
Bioquímica - do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular - Setor
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.

**Orientador: Prof. Dr. David A.
Mitchell**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Nadia
Krieger.**

**Curitiba
2009**

TÉRMO DE APROVAÇÃO

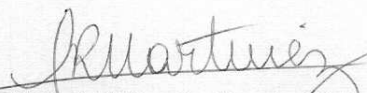
ARQUIMEDES PAIXÃO DE SANTANA FILHO

RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: ESTUDOS DE PRODUÇÃO E DE VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE HOMÓLOGOS

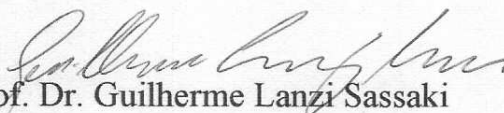
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



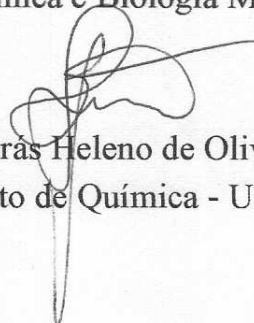
Prof. Dr. David Alexander Mitchell (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^ª Dr^ª Gláucia Regina Martinez
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Departamento de Química - UFPR

Curitiba, 06 de fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

À minha família.

Aos meus orientadores, professor David Mitchell e professora Nádia Krieger, principalmente pela confiança.

A todos os meus amigos da turma de mestrado em bioquímica.

Aos meus amigos do departamento de química.

Ao professor Guilherme L. Sasaki (Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR) e ao aluno de Pós-Doutorado Lauro M. de Souza, que possibilitaram a realização das análises de caracterização molecular e estrutural neste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, em especial ao Doutorando Doumit Camilios Neto, pelo constante auxílio e orientação.

Aos meus amigos do Laboratório de Química de Carboidratos.

Aos meus amigos do curso de Biologia da Universidade Federal de Alagoas.

Aos meus amigos em São Paulo, Mônica Carnaúba, Joel Alexandre, Alexandre Facciola, Nelson, Elaine.

A todos os funcionários e professores do departamento de bioquímica, que contribuíram para minha formação.

À professora Sílvia Cadena, com quem realizei o meu estágio de docência.

Às agências financiadoras.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Composição e Propriedades Físico-Químicas de Biossurfactantes.....	17
2.2. Classificação dos Biossurfactantes.....	18
2.3. Produção de biossurfactantes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.3.1. Meios e condições de cultura para a produção de ramnolipídeos.....	22
2.3.2. Composição da mistura de homólogos de ramnolipídeos.....	25
2.4. Propriedades físico-químicas de ramnolipídeos.....	32
2.5. Aplicações dos Biossurfactantes.....	34
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1. Microrganismo.....	40
4.2. Pré – inóculo.....	40
4.3. Produção do Biossurfactante.....	40
4.4. Otimização das condições de produção.....	41
4.5. Triagem de componentes do meio de fermentação.....	43
4.6. Extração dos ramnolipídeos.....	44
4.7. Métodos Analíticos.....	45
4.7.1. Determinação do crescimento bacteriano.....	45
4.7.2. Determinação da tensão superficial (TS).....	45
4.7.3. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	45
4.7.4. Medida do Índice de Emulsificação (E_{24}).....	46
4.7.5. Quantificação dos ramnolipídeos.....	46
4.7.6. Quantificação do glicerol.....	47
4.7.7. Espectrometria de massas acoplada à ionização por eletrospray.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. Influência da relação carbono-nitrogênio na otimização das condições de produção de ramnolipídeos.....	51
5.1.1. Aumento da relação carbono-nitrogênio pela diminuição da quantidade de nitrogênio.....	51
5.1.2. Aumento da relação carbono-nitrogênio pelo aumento da concentração da fonte de carbono (glicerol).....	52
5.1.3. Efeito da concentração do inóculo.....	54
5.2. Triagem dos componentes do meio de fermentação.....	55
5.2.1. Efeito da fonte de nitrogênio.....	56
5.2.2. Efeito combinado da concentração de inóculo e da fonte de nitrogênio....	56
5.2.3. Concentração da fonte de nitrogênio.....	57
5.2.4. Efeito da concentração de glicerol.....	59
5.3. Cinética de produção de ramnolipídeos.....	59
5.4. Avaliação da variação da composição molecular e estrutural da mistura de ramnolipídeos durante o cultivo.....	62
5.6. Propriedades físico-químicas do biossurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614.....	68

5.6.1. Concentração Micelar Crítica (CMC) e Índice de Emulsificação (E_{24}).....	68
6. CONCLUSÕES.....	73
6.1. Otimização das condições da produção de ramnolipídeos.....	73
6.2. Triagem dos componentes do meio de fermentação.....	73
6.3. Cinética de produção de ramnolipídeos utilizando as condições selecionadas.....	73
6.4. Avaliação da variação da composição molecular e estrutural da mistura de ramnolipídeos durante o cultivo.....	74
6.5. Propriedades físico-químicas das misturas de homólogos de ramnolipídeos produzidas em diferentes tempos de cultivo.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXOS.....	83
Anexo 1.....	84
Anexo 2.....	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA VARIAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL, INTERFACIAL E SOLUBILIDADE DO COMPOSTO ORGÂNICO COM A CONCENTRAÇÃO DO TENSIOATIVO.

FIGURA 2. ESTRUTURA DE ALGUNS BIOSSURFACTANTES LISTADOS NA TABELA 1

FIGURA 3. RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa*

FIGURA 4. FRAGMENTOS PRODUZIDOS POR DOIS HOMÓLOGOS DE RAMNOLIPÍDEOS COM A MESMA MASSA MOLAR

FIGURA 5. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA NOS EXPERIMENTOS DE DELINEAMENTO FATORIAL REALIZADOS POR Monteiro *et al.* (2007)

FIGURA 6. CURVA DE CRESCIMENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM MEIO LÍQUIDO LURIA BERTANI (LB)

FIGURA 7. CURVA PADRÃO DE AÇÚCARES TOTAIS POR RAMNOSE (mg/L), CONSTRUÍDA UTILIZANDO O MÉTODO DE Dubois *et al.* (1956)

FIGURA 8. REAÇÃO QUÍMICA DO GLICEROL COM FORMALDEÍDO FORMANDO O COMPLEXO COLORIMÉTRICO 3,5-1,4-DIIDROLUTIDINA (410 nm), PELO MÉTODO DE Soloni (1971)

FIGURA 9. CURVA-PADRÃO DE GLICEROL, CONSTRUÍDA UTILIZANDO-SE O MÉTODO COLORIMÉTRICO-QUÍMICO DE Soloni (1971)

FIGURA 10. EFEITO DA RELAÇÃO CARBONO-NITROGÊNIO (C/N) NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 11. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 12. EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E DO TEOR DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 13. EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 14. EFEITO DAS VARIÁVEIS CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 15. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO DE SÓDIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 16. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 17. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 18. EFEITO DO PROCESSO DE ALIMENTAÇÃO DA FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 19. ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS COM AS AMOSTRAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO, CONFORME AS CONDIÇÕES SELECIONADAS NO ITEM 5.2

FIGURA 20. VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS HOMÓLOGOS DE RAMNOLIPÍDEOS COM O TEMPO DE CULTIVO PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

FIGURA 21. COMPARAÇÃO ENTRE HOMÓLOGOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PRINCIPAIS TIPOS DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

TABELA 2. PRINCIPAIS ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

TABELA 3. COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Pseudomonas*

TABELA 4. ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE RAMNOLIPÍDEOS POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

TABELA 5. ÍNDICES DE EMULSIFICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR DIFERENTES CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* OBTIDOS FRENTE A DIFERENTES HIDROCARBONETOS

TABELA 6. BIOSSURFACTANTES E RAMOS INDUSTRIAIS DE APLICAÇÃO

TABELA 7. VARIÁVEIS E VALORES SELECIONADOS PARA O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

TABELA 8. COMPARAÇÃO ENTRE OS RENDIMENTOS E PRODUTIVIDADES DE RAMNOLIPÍDEOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

TABELA 9. ESTRUTURA QUÍMICA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS HOMÓLOGOS PRESENTES NA MISTURA DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO

TABELA 10. RELAÇÃO ENTRE A COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL DAS AMOSTRAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO, E AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS APRESENTADAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

C/N	Relação carbono-nitrogênio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
D.O.	Densidade Óptica
E_{24}	Índice de emulsificação
ESI-MS	Electrospray-ionisation-mass-spectrometry
ESI-MS-MS	Electrospray-ionisation-mass-spectrometry <i>in Tandem</i>
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
LB	Meio de cultura Luria Bertani
m/z	Relação massa/carga
MEOR	Microbiologically Enhanced Oil Recovery
Qp	Produtividade volumétrica
Rha-/Rha ₂	Representação de um monoramnolípídeo/dirramnolípídeo
RNM	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
R _{mo:di}	Razão monoramnolípídeo:dirramnolípídeo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TI	Tensão interfacial
TS	Tensão superficial
TSA	Ágar Trípico de Soja
Yp/s	Coefficiente de rendimento do produto formado em relação ao consumo de substrato

RESUMO

Neste trabalho foram testados diferentes tipos e concentrações de fontes de nitrogênio e diferentes concentrações de inóculo e glicerol, visando otimizar a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, que atingiu 15,9 g/L, baseado em dosagens de ramnose e o uso de um fator de correção de 3,2, após sete dias de cultivo, utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (5 g/L) e glicerol como fonte de carbono (40 g/L). A metodologia utilizada nas análises estruturais (espectrometria de massa com ionização por eletrospray, ESI-MS) permitiu a detecção de 6 principais homólogos, 3 dirramnolipídeos e 3 monorramnolipídeos, sendo os mais abundantes Rha₂-C₁₀-C₁₀ e Rha-C₁₀-C₁₀. A proporção destes homólogos variou em diferentes tempos de cultivo analisados (1 a 9 dias), revelando uma predominância de monorramnolipídeos nos primeiros dois dias de cultivo. A análise das propriedades físico-químicas da mistura de homólogos produzidas em diferentes tempos de cultivo mostrou que a concentração micelar crítica (CMC) variou de 15,6 mg/L, para o primeiro dia de fermentação, a 31,2 mg/L para períodos maiores de cultivo analisados, valores que se situam entre os melhores resultados de CMC reportados na literatura para ramnolipídeos. Entretanto, nas determinações de índice de emulsificação (E_{24}), os melhores resultados (79, 59 e 72%, frente a gasolina diesel e querosene, respectivamente) foram encontrados para as amostras provenientes dos tempos de cultivo de 9 dias, que apresentou valores de CMC maiores. A análise comparativa da variação da proporção dos homólogos e das propriedades físico-químicas apresentadas pela mistura de ramnolipídeos permitiu concluir que esta variação influencia diretamente nas propriedades físico-químicas, pois a presença de uma maior proporção de homólogos de monorramnolipídeos diminui a CMC, enquanto que o aumento de proporção de dirramnolipídeos aumenta os valores deste parâmetro. Porém, nas análises de E_{24} , a presença dos monorramnolipídeos em maior quantidade prejudicou a estabilização das emulsões formadas.

ABSTRACT

The aim of the current work was to optimize the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Tests were done with several different nitrogen sources at different concentrations, several different inoculum concentrations and several different glycerol concentrations. The best production level was 15,9 g/L, based on measurement of the amount of rhamnose and a correction factor of 3.2, after 7 days of culture, using 5 g/L sodium nitrate as the nitrogen source and 40 g/L glycerol as the carbon source. Structural analyses were undertaken, using mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-MS). Six main homologues were detected, including three dirhamnolipids and three monorhamnolipids, with the most abundant homologues being Rha₂-C₁₀-C₁₀ and Rha-C₁₀-C₁₀. The proportions of the various homologues varied during the 9-day cultivation, with monorhamnolipids predominating over the first two days. The physicochemical properties of the homologue mixture produced also varied with cultivation time: The critical micellar concentration (CMC) was 15.6 mg/L on the first day of culture, but rose to 31.2 mg/L for later samples. These CMC values are amongst the best reported in the literature for rhamnolipids. The best values of the emulsification index after 24 h (E_{24}) were obtained using rhamnolipid samples extracted from a 9-day culture, with E_{24} values of 79, 59 and 72% against gasoline, diesel and kerosene, respectively. It was concluded that a higher proportion of monorhamnolipids in the sample decreases the CMC while a higher proportion of dirhamnolipids increases it. On the other hand, the presence of high concentrations of monorhamnolipids leads to unstable emulsions.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas que possuem a característica de reduzir a tensão superficial, ou seja, a força existente na interface ar-líquido e a tensão interfacial, que é a força entre uma superfície de contato líquido-líquido (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998). Quando moléculas com essas propriedades são produzidas por organismos biológicos, são denominadas biossurfactantes. Os biossurfactantes apresentam características vantajosas em relação a suas contrapartes sintéticas, cuja maioria é proveniente de derivados de petróleo, como baixa toxicidade e excelente biodegradabilidade (HABA *et al.*, 2000). A estrutura dessas moléculas difere muito, mas sempre inclui uma porção hidrofílica, composta de aminoácidos ou de sacarídeos, e uma hidrofóbica, contendo cadeias alifáticas, geralmente ácidos graxos (GARCÍA-JUNCO *et al.*, 2001). Entre as moléculas descritas como biossurfactantes estão os glicolípideos (ramnolípideos, soforolípideos, trealolípideos), lipopeptídeos (surfactina, viscosina, polimixina), complexos de polissacarídeos e proteínas (Liposan®), fosfolípideos e ácidos graxos (LIN *et al.*, 1998).

Atualmente, os biossurfactantes são ótimos candidatos em processos de biorremediação, tanto de solo como de efluentes, uma vez que o uso de surfactantes químicos resulta muitas vezes em uma contaminação secundária do local. Outras aplicações que vêm se destacando são os seus usos em processos de recuperação melhorada de petróleo (MEOR, “*Microbially Enhanced Oil Recovery*”) e na indústria alimentícia. Entretanto, o que ainda impede o pleno desenvolvimento dessa área é a dificuldade de produção de quantidades apreciáveis de biossurfactantes de forma economicamente viável. Sendo assim, torna-se essencial a busca de estratégias de otimização da produção de biossurfactantes de modo a eliminar este obstáculo.

O microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, isolado de poços de petróleo, já demonstrou, em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química da UFPR, a capacidade de produzir ramnolípideos em concentrações de até 12,4 g/L (utilizando um fator de conversão ramnose - ramnolípideos de 3,2). Este composto é sintetizado pela bactéria como uma mistura de 12 homólogos (6 monorramnolípideos e 6 dirramnolípideos) (MONTEIRO *et al.* 2007). Estes mesmos estudos indicaram que modificações na composição do meio de cultivo envolvendo o aumento da relação carbono-nitrogênio (C/N) influenciariam positivamente na produção dos ramnolípideos. Embora diversos autores tenham realizado estudos visando determinar a

composição de meios de cultura que aumentem a produtividade dos ramnolipídeos, nenhum deles associou estudos de otimização do meio de cultivo a análises estruturais dos homólogos de ramnolipídeos produzidos, em diferentes tempos de fermentação, na condição otimizada.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo a otimização da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, através da variação da composição do meio e do tempo de cultivo e a análise da composição dos homólogos que compõem a mistura de biossurfactantes produzidos em função do tempo de cultivo, na condição otimizada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica aqui desenvolvida tem como foco principal a definição de biossurfactantes, sua classificação e natureza química e métodos de produção. Posteriormente aspectos estruturais e relativos à aplicação também serão abordados.

2.1. Composição e Propriedades Físico-Químicas de Biossurfactantes

O grupo de compostos conhecidos como surfactantes compreende moléculas anfipáticas, ou seja, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que possuem a característica de reduzir a tensão superficial (TS), que é a força existente entre uma superfície ar-líquido e a tensão interfacial (TI), que é a força existente entre uma superfície líquido-líquido (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998), sendo que neste último caso, podem ser chamados também de emulsificantes. Surfactantes podem ser de origem química ou biológica; quando produzidos por organismos vivos, são denominados biossurfactantes.

Os indicadores mais largamente utilizados para medir a atividade surfactante são os parâmetros tensão superficial, tensão interfacial e a concentração micelar crítica (CMC). As tensões superficial e interfacial referem-se ao posicionamento das moléculas nas interfaces ar/líquido e líquido/líquido, respectivamente, com uma orientação específica também conhecida como adsorção. A CMC é definida como a mínima concentração de surfactante onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas, que conferirá as propriedades de detergência e solubilização de compostos hidrofóbicos (FIGURA 1). Em concentrações acima da CMC, o tensioativo aumenta a solubilidade de compostos orgânicos com baixa solubilidade em água, sendo o composto incorporado no interior da micela; contudo, as tensões superficial e interfacial da solução permanecem quase constantes. Quanto menor é o valor de CMC, maior a eficiência do biossurfactante (MULLIGAN, 2005; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Sendo assim, pode-se dizer que a CMC é uma importante característica dos surfactantes no que diz respeito à avaliação de sua eficiência. Os biossurfactantes possuem menor CMC (0,001 – 2 g/L) em comparação aos surfactantes sintéticos. Como exemplo tem-se o SDS (dodecil sulfato de sódio), um dos surfactantes químicos mais comuns, que possui uma

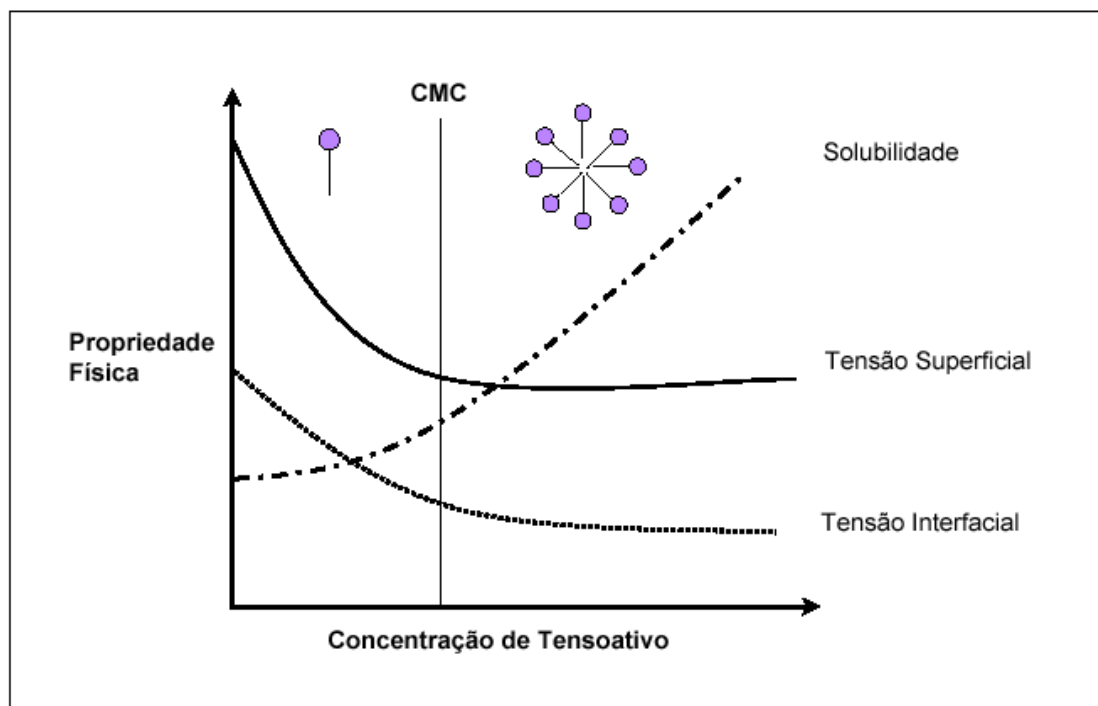


FIGURA 1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA VARIAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL, INTERFACIAL E SOLUBILIDADE DO COMPOSTO ORGÂNICO COM A CONCENTRAÇÃO DO TENSIOATIVO.

Fonte: adaptado de Mulligan, (2001).

CMC de 2,4 g/L (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Com base nessas características, os biossurfactantes são tidos como mais eficientes que seus homólogos químicos, pois exercem o mesmo efeito em concentrações muito menores.

2.2. Classificação dos Biossurfactantes

Diferentemente do que ocorre com os surfactantes químicos, os quais são classificados de acordo com a natureza de seu grupamento polar, a classificação dos biossurfactantes usa como base sua composição química e sua origem microbiana (DESAI & BANAT, 1997). De uma maneira geral, eles podem ser divididos em dois grandes grupos: biossurfactantes de alta massa molar e biossurfactantes de baixa massa molar (RON & ROSENBERG, 2001). Os biossurfactantes de alta massa molar incluem um grande número de compostos poliméricos

extracelulares constituídos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (RON & ROSENBERG, 2001). Os mais bem estudados representantes dessa classe são Biodispersan, Emulsan e Liposan® (Primex, Islândia) sendo todos complexos de polissacarídeos com proteínas. O segundo grupo inclui, além dos ácidos graxos, fosfolipídeos e lipídeos neutros, os lipopeptídeos e os glicolipídeos. Os lipopeptídeos mais pesquisados incluem a surfactina, estreptofactina e polimixinas, enquanto que os glicolipídeos mais estudados são os trealolipídeos, soforolipídeos e os ramnolipídeos (RON & ROSENBERG, 2001; DESAI & BANAT, 1997), os quais serão abordados de forma mais detalhada adiante. Um resumo dos tipos de biossurfactantes e dos microrganismos produtores pode ser encontrado na TABELA 1 e na FIGURA 2 pode-se visualizar algumas das estruturas destes compostos.

TABELA 1. PRINCIPAIS TIPOS DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

Tipo de biossurfactante	Microrganismo produtor
Glicolipídeos	
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Rhodococcus ruber</i>
Trealose micolato	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i>
Micolatos de mono, di e trissacarídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i>
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i> , <i>Candida spp.</i>
Diglicosil diglicerídeo	<i>Lactobacillus fermentii</i> <i>Arthrobacter spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Candida spp.</i>

Fonte: adaptada de Santos (2003), Christofi e Ivshina (2002), Lang (2002) e Mulligan *et al.*, (2001).

TABELA 1. PRINCIPAIS TIPOS DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS (CONTINUAÇÃO)

Tipo de biossurfactante	Microrganismo produtor
Fosfolipídeos e ácidos graxos	
Subtilisina e Sufactina Lichesina	<i>Candida spp.</i>
	<i>Corynebacterium spp.</i>
	<i>Micrococcus spp.</i>
	<i>Acinetobacter spp.</i>
	<i>Streptomyces sioyaensis</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Arthrobacter sp.</i>
	<i>Bacillus pumilis</i>
Surfactantes Poliméricos	
Emulsan e Biodispersan Liposan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	<i>A. calcoaceticus</i> A2
	<i>A. calcoaceticus</i>
	<i>Candida lipolytica</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Candida petrophilum</i>
	<i>Endomycopsis lipolytica</i>
	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Shizonella melanogramma</i>
	<i>Ustilago maydis</i>
	<i>Candida antártica</i> T-34 e KCTC 7804
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Debaryomyces polymorphus</i>
	<i>Penicillium spiculisporum</i>
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
	<i>Aspergillus spp.</i>
	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
<i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	
<i>Rhodotorula glutinus</i>	
<i>Rhodotorula graminus</i>	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	
Serrawetina	<i>S. marcenscens</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixinas	<i>Bacillus polymyxas</i>
	<i>Pseudomonas rubescens</i>
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
	<i>Gluconobacter cerinus</i>
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Fonte: adaptada de Santos (2003), Christofi e Ivshina (2002), Lang (2002) e Mulligan *et al.* (2001).

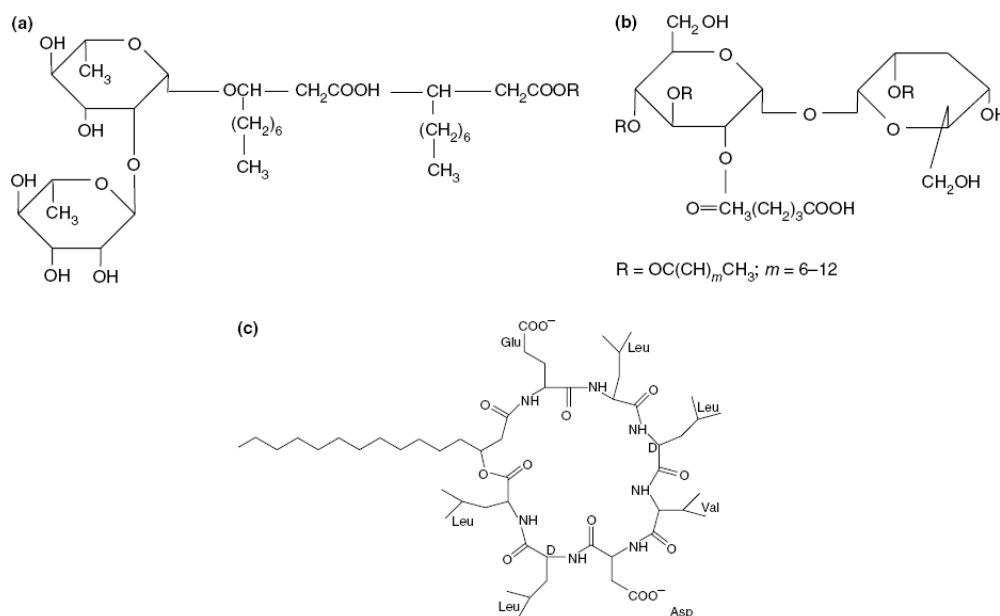


FIGURA 2. ESTRUTURA DE ALGUNS BIOSSURFACTANTES LISTADOS NA TABELA 1

(a) ramnolípídeo, (b) trealolípídeos e (c) surfactina. Fonte: adaptado de Christofi & Ivshna (2002).

2.3. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*

Diversos estudos enfocam o isolamento de microrganismos degradadores de óleos combustíveis, lubrificantes, óleos vegetais de várias origens, resíduos de indústrias de óleos e outras atividades agroindustriais (MANEERAT, 2005; BENTO *et al.*, 2005; CHRISTOFI & IVSCHINA, 2002). Estes microrganismos desenvolvem diversas estratégias para solubilizar os compostos orgânicos hidrofóbicos presentes nos substratos citados, dentre as quais, a produção de surfactantes, disponibilizando-os para serem utilizados como fonte de carbono (NITSCHKE *et al.*, 2004). A produção de biossurfactantes por microrganismos é extensivamente relatada, principalmente os pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, a partir de fontes renováveis como óleo vegetal, resíduos de indústria de óleo (HABA *et al.*, 2000), água residuais de agroindústrias (NITSCHKE & PASTORE, 2006; 2003), gordura animal, efluentes de indústrias de óleo de oliva, óleo queimado, soro de leite e efluentes ricos em amido (MANEERAT, 2005). Entre os substratos não lipídicos, destacam-se o glicerol, a glucose e o manitol (WU *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2007; DEZIEL *et al.*, 1999).

2.3.1. Meios e condições de cultura para a produção de ramnolipídeos

A TABELA 2 apresenta alguns estudos relatados em literatura sobre a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas* sp.

Um dos fatores que influencia diretamente na produtividade de ramnolipídeos é a relação carbono-nitrogênio (C/N), entretanto, não existem muitos estudos envolvendo esta variável. Valores de relação C/N de 18 (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984), 10 (ABOUSEOUD *et al.*, 2008), 20 (RAZA *et al.*, 2007) e 55 (MONTEIRO, 2007) são reportados na literatura. Essa grande variação pode ser resultado de diversos fatores, como da cepa de *P. aeruginosa* utilizada, tipo de fonte de carbono e nitrogênio. Alguns autores demonstram haver uma linearidade entre aumento da relação C/N e produção de ramnolipídeos, enquanto outros citam a existência de uma relação inversa, ou seja, um aumento da produtividade de ramnolipídeos com a diminuição da relação C/N (ARINO *et al.*, 1996; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984). A única constante em todos os casos é que, após se atingir um valor de C/N ótimo, a produção de ramnolipídeos decresce abruptamente. No estudo de Mulligan e Gibbs (1989), os autores fazem a correlação entre a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* e a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio, utilizando fontes orgânicas e inorgânicas deste elemento. Os resultados demonstraram que a produção de ramnolipídeos é ativada sob condições de limitação de nitrogênio, sendo que os autores chegam a propor a avaliação da atividade de enzimas como a glutamina sintetase como uma forma de *screening* para isolados de *Pseudomonas* promissores na produção de glicolipídeos.

Em relação à fonte de nitrogênio utilizada, os estudos da literatura (TABELA 2) comprovam que fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e nitratos) são as mais utilizadas, por serem reportadas como melhores que as fontes orgânicas como extrato de levedura (WU *et al.*, 2008; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984). Na TABELA 2, observa-se também que não existe uma correlação direta entre a quantidade de nitrato de sódio presente no meio e a produção de ramnolipídeos. Por exemplo, valores de 6,5 g/L, 4,9 g/L e 4,0 g/L de nitrato de sódio (utilizados por WU *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2006 e ARINO *et al.*, 1996) produziram 18,5 g/L, 8,6 g/L e 9 g/L de ramnolipídeos, respectivamente.

As fontes de carbono utilizadas para promover a síntese de ramnolipídeos por cepas de *P. aeruginosa* podem ser divididas em dois principais tipos (TABELA 2): lipídicas e glicídicas, sendo que cada um destes tipos irá influenciar na quantidade final de ramnolipídeos e na composição da mistura de homólogos produzidos pelo microrganismo (NITSCHKE *et al.*, 2005).

TABELA 2. PRINCIPAIS ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Cepa	Fonte de Carbono (g/L)	Fonte de nitrogênio (g/L)	Tempo de fermentação (dias)	Ramnolipídeos (g/L)	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose (18)	NaNO ₃ (2,5)	nd	1,5	Guerra-Santos <i>et al.</i> , 1986
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP	Manitol (20)	NaNO ₃ (2,0)	14	2,3	Dèziel <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UG2	Óleo de milho (12,75)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,74)	16	4,38	Mata-Sandoval <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LB1	Água de processamento de óleo de girassol (30)	NaNO ₃ (5)	3	7,0	Benincasa & Accorsini, 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	Óleo derivado de processos de fritura (40)	NaNO ₃ (5)	4	8,1	Haba <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 4025	n-Parafina (100)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (4)	2	8,5	Itoh <i>et al.</i> , 1971
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM1	Glucose (30,5)	NaNO ₃ (4,9)	7	8,6	Wu <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Ácidos graxos livres derivados de óleo de soja (50)	NaNO ₃ (5)	4	9,5	Abalos <i>et al.</i> , 2001.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LB1	Soapstock (subproduto obtido do refino do óleo de soja bruto) (20)	nd	6	11,7	Nitschke <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	Glicerol (30)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1)	9	12,4	Monteiro <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LB1	Soapstock (subproduto obtido do refino do óleo de soja bruto) (20)	NaNO ₃ (4)	3	15,8	Benincasa <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL1	Glicerol (30)	NaNO ₃ (6,5)	8	17,9	Arino <i>et al.</i> , 1996

nd: não determinado

TABELA 2. PRINCIPAIS ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* (CONTINUAÇÃO)

Cepa	Fonte de Carbono (g/L)	Fonte de nitrogênio (g/L)	Tempo de fermentação (dias)	Ramnolipídeos (g/L)	Referências
<i>P. aeruginosa</i> <i>aeruginosa</i> AT10	Acidos graxos (50)	NaNO ₃ (4,6)	4	18,7	Abalos <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> UFPEDA 614	Glicerol (120)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1)	12	46,0	Camilios Neto <i>et al.</i> , 2008

nd: não determinado

De uma maneira geral, pode-se considerar que as fontes lipídicas são as que proporcionam um maior rendimento final de ramnolipídeos, porém muitas vezes os homólogos produzidos não proporcionam propriedades físico-químicas vantajosas (LANG & WULLBRANDT, 1999; MATA SANDOVAL *et al.*, 1999).

No que se refere à temperatura e pH ótimos para promover a produção de ramnolipídeos, existem algumas variações, decorrentes principalmente da cepa de *Pseudomonas* utilizada no estudo, mas em geral os valores reportados na literatura variam entre pH 6,2 e 6,0 (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986), e pH 7,0 (BONILA *et al.*, 2005), e temperaturas entre 28 e 37° C (DÉZIEL *et al.*, 2000, MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999; DESAI & BANAT, 1997; ARINO *et al.*, 1996).

2.3.2. Composição da mistura de homólogos de ramnolipídeos

Biossurfactantes do tipo ramnolipídeos são produzidos como uma mistura de homólogos, que somente mais recentemente tiveram a sua composição esclarecida. A composição da mistura depende das condições de cultura, (composição dos substratos, pH, temperatura), da idade da cultura e das linhagens utilizadas.

O interesse recente por biossurfactantes, principalmente os ramnolipídeos, deve-se às suas propriedades tensioativas e emulsificantes, que por sua vez se devem à composição da mistura de homólogos produzidos (TABELA 3) (SINGH *et al.*, 2007; MULLIGAN, 2005). Se a composição da mistura de ramnolipídeos for elucidada, a contribuição individual de cada um dos homólogos nas suas propriedades físicas pode ser estabelecida, sendo possível obter uma mistura com propriedades desejáveis para usos específicos (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Os primeiros relatos de glicolipídeos, que contém unidades de ramnose unidas a ácidos graxos β -hidroxilados, foram descritos inicialmente por Bergstrom *et al.*, (1947), que empregou uma cepa de *Pseudomonas pyocyanea*, e como fonte de carbono, a glucose. Posteriormente, Jarvis e Johnson (1949) descreveram a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* em um meio contendo peptona e glicerol 3% (m/v), obtendo quantidades de ramnolipídeos de 2,5 g/L. Neste artigo são relatadas, pela primeira vez, a razão entre as unidades de ramnose e dos ácidos graxos β -hidroxilados e também a propriedade bacteriostática do biossurfactante sintetizado. A partir daí, diversos trabalhos foram publicados, com diferentes cepas de *Pseudomonas*, com diferentes homólogos ou misturas de

homólogos de ramnolipídeos sendo relatadas em diferentes condições de cultivo (TABELA 3).

TABELA 3. COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Pseudomonas*

Cepa	Tipo de Ramnolipídeo	TS (mN/m)	TI (mN/m)	CMC (mg/L)	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	Mistura de homólogos ^e	32,8	1 ^a	108,8	Haba <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	28,8	nd	105,0	Abalos <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Mistura de homólogos ^c	27,3	nd	234	Abalos <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Mistura de homólogos ^d	26,8	nd	150	Abalos <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Mistura de homólogos	24,0	1,31 ^b	120	Benincasa <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	25,0	0,2 ^a	11	Parra <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	25,0	1,0 ^a	11	Parra <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ + Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	26,0	< 1,0 ^b	20	Parra <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	Mistura de homólogos	28,0	< 1,0 ^b	20	Syldatk <i>et al.</i> , 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	27,0	< 1,0 ^b	10	Syldatk <i>et al.</i> , 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	Rha ₂ -C ₁₀	30,0	< 1,0 ^b	200	Syldatk <i>et al.</i> , 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	Rha-C ₁₀	25,0	< 1,0 ^b	200	Syldatk <i>et al.</i> , 1985
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UG-2	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ + Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	31,0	nd	53	Mata-Sandoval <i>et al.</i> , 1999

TS – tensão superficial, TI – tensão interfacial, CMC – concentração micelar crítica. nd: não determinado.

^a contra querosene, ^b contra hexadecano, ^c RHA-c₁₀-c₁₀ + RHA₂-c₁₀-c₁₀ + RHA-c₁₀-c₁₂ + RHA-c_{12:1}-c₁₀ + RHA-c_{12:2} + RHA-c₈-c₂, ^d RHA₂-c₁₀-c₁₀ + RHA-c₁₀-c₁₀ + RHA₂-c₁₀-c₁₂ + RHA-c₁₀-c₁₂ + RHA-c_{12:1}-c₁₀ + RHA-c_{8:2}, ^e RHA-c₁₀-c₁₀; RHA-c₁₀-c₈; RHA-c₈-c₁₀; RHA-c₁₀-c_{12:1}; RHA-c₁₂-c₁₀; RHA-c₁₀-c₁₂; rha₂-c₁₀-c₁₀; RHA₂-c₁₀-c₈; RHA₂-c₈-c₁₀; RHA₂-c₁₀-c_{12:1}; RHA₂-c₁₂-c₁₀; RHA₂-c₁₀-c₁₂.

Atualmente, sabe-se que *P. aeruginosa* produz dois principais grupos de ramnolipídeos: os monorramnolipídeos, contendo uma unidade de ramnose ligada aos ácidos graxos β -hidroxilados, e os dirramnolipídeos, compostos por duas unidades de ramnose unidas a estes ácidos (FIGURA 3). Cada um destes dois grupos subdivide-se de acordo com as unidades e tipos de ácidos β -hidroxilados ligados. Desai e Banat (1997) citam que o L-Ramnosil-L-rhamnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha₂-C₁₀-C₁₀, um dirramnolipídeo) e L-Rhamnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha-C₁₀-C₁₀, um monorramnolipídeo) são os principais glicolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*; entretanto, é também relatada a síntese de ramnolipídeos contendo apenas uma unidade de ácido graxo β -hidroxilado ligado a uma ou duas moléculas de ramnose (SYLDATK *et al.*, 1985), ou com cadeias de ácidos graxos variando de 8 a 12 ou mais carbonos, e com uma ou duas insaturações (LANG & WULLBRANDT, 1999). É importante salientar que, na detecção dos homólogos produzidos pelas diferentes cepas, a metodologia de análise é um fator preponderante e que os trabalhos citados na TABELA 3 nem sempre utilizaram metodologias suficientemente sofisticadas para permitir a elucidação completa da composição da mistura.

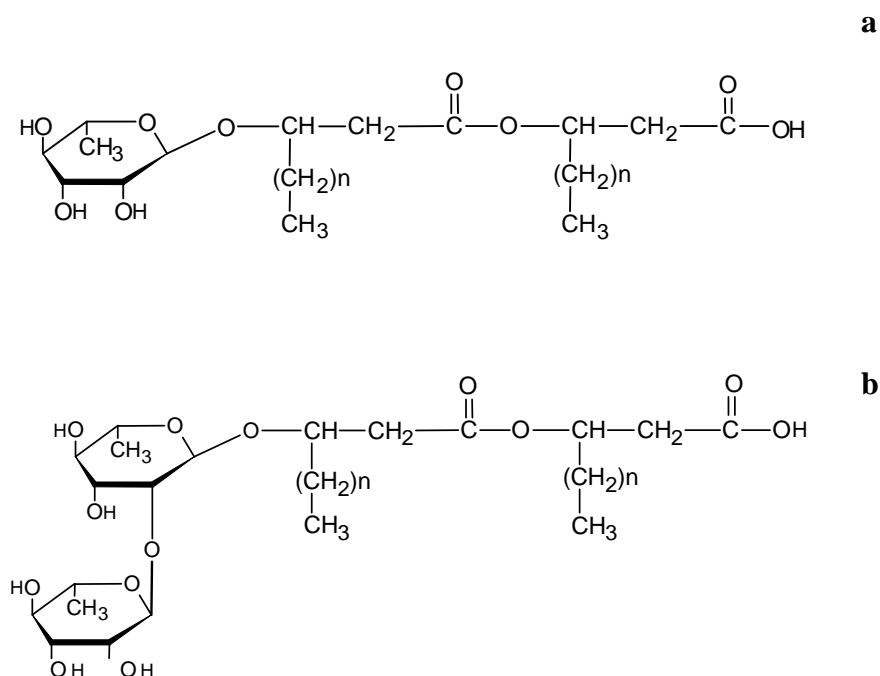


FIGURA 3. RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa*

Legenda: (a) - monorramnolipídeo; (b) - dirramnolipídeo. Fonte: Monteiro, (2007).

Ramnolipídeos são produzidos durante a fase estacionária do ciclo de crescimento, sendo assim considerados metabólitos secundários (RON & ROSEMBERG, 2001), entretanto, o seu papel fisiológico ainda não foi completamente elucidado, uma vez que a presença de fontes de carbono lipídicas não é um pré-requisito para ativar sua síntese. Alguns autores citam que o mecanismo de patogenicidade de algumas cepas depende da ativação de genes relacionados a esta síntese (ALONSO *et al.*, 1999).

Diversos estudos relatam a produção de múltiplos homólogos de ramnolipídeos por cepas de *P. aeruginosa* das mais variadas origens. As diversas condições de cultivo a que essas cepas são submetidas comprovam que, não só a origem destas cepas, mas também as fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas nas fermentações, assim como a idade do cultivo, influenciam na composição da mistura de homólogos, como demonstrado na TABELA 4.

Os métodos usados na identificação dos ramnolipídeos, conforme já mencionado anteriormente, são de crucial importância na elucidação das estruturas e geralmente envolvem inicialmente uma separação cromatográfica das misturas em várias frações por cromatografia em camada delgada, e em seguida, a espectrometria de massas aliada à ionização por eletrospray (ESI-MS), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o uso conjunto dessas duas técnicas. O uso isolado de CLAE possui algumas limitações, pois na maioria dos casos modificações químicas nas moléculas de ramnolipídeos têm de ser utilizadas para proporcionar a sua quantificação. Por exemplo, a preparação de ésteres de p-bromocresil dos homólogos, objetivando posterior detecção por um detector UV acoplado a CLAE (SCHENK *et al.*, 1995), ou a derivatização química para produzir ésteres de ramnolipídeos do tipo fenacil, também objetivando sua detecção por UV após separação em CLAE (WU *et al.*, 2008; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999). Estas metodologias consomem tempo e dificultam a comparação com outros resultados presentes na literatura.

Por outro lado, a técnica de ESI-MS permitiu a elucidação da maioria das estruturas dos ramnolipídeos descritas até hoje (MONTEIRO *et al.*, 2007; NITSCHKE *et al.*, 2005; DEZIEL *et al.*, 2000; DEZIEL *et al.*, 1999). A vantagem proporcionada por essa técnica é que, na maioria dos equipamentos, pode-se realizar a ionização das moléculas utilizando-se diferentes voltagens no cone de ionização (entre 35 e 80 V). Isto possibilita a análise dos íons moleculares e dos íons originados pela fragmentação das moléculas, já que diversos dos isômeros de ramnolipídeos formam fragmentos com diferentes relações massa-carga (m/z). Em alguns equipamentos, um segundo analisador de massas (ESI-MS-MS) acoplado a uma câmara de colisão permite o uso da técnica de fragmentação (onde se utiliza, em geral, o argônio como gás de colisão), permitindo analisar os isômeros de ramnolipídeos que

TABELA 4. ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE RAMNOLIPÍDEOS POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

Cepa	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Tempo de cultivo (dias)	Principais homólogos produzidos	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP	Manitol	NaNO ₃	nd	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ , Rha-C ₁₀ -C ₈ e Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Deziel <i>et al.</i> , 2000.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Soapstock (subproduto obtido do refino do óleo de soja bruto)	NaNO ₃	nd	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ e Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Benincasa <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	Óleo de palma	Peptona	2	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Pornsunthorntawee <i>et al.</i> , 2008.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Ácidos graxos livres derivados de óleo de soja	NaNO ₃	4	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ e Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Abalos <i>et al.</i> , 2002.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Ácidos graxos livres derivados de óleo de soja	NaNO ₃	4	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ e Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Abalos <i>et al.</i> , 2001.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	Óleo derivado de processos de fritura	NaNO ₃	4	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ , Rha-C ₁₀ -C ₁₀ e Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	Haba <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Óleos vegetais brasileiros	NaNO ₃	5	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ e Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Costa <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Glucose	NaNO ₃	6	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Nitschke <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 2659	Glucose	NaNO ₃	7	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ e Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Schenk <i>et al.</i> , 1995.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AP02-1	Glicerol	(NH ₄) ₂ SO ₄	7	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ e Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Perfumo <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	Glicerol	(NH ₄) ₂ SO ₄	9	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ e Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Monteiro <i>et al.</i> , 2007.

nd: não determinado

TABELA 4. ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE RAMNOLIPÍDEOS POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO (CONTINUAÇÃO)

Cepa	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Tempo de fermentação (dias)	Principais homólogos produzidos	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP	Naftaleno	NaNO ₃	14	Rha ₂ -C ₁₀	Deziel <i>et al.</i> , 1999.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UG2	Óleo de milho	(NH ₄) ₂ SO ₄	16	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ e Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	Mata-Sandoval <i>et al.</i> , 1999

nd: não determinado

apresentam a mesma massa, porém diferem, por exemplo, na cadeia de ácido graxo ligada a unidade de ramnose (FIGURA 4). Por exemplo, com o uso dessa técnica pode-se determinar se um dirramnolipídeo contendo duas cadeias de ácidos graxos β -hidroxilados, uma com 8 e outra com 10 carbonos, possuía a cadeia mais longa ou a mais curta ligada a molécula de ramnose (MONTEIRO *et al.*, 2007; NITSCHKE *et al.*, 2005; DEZIEL *et al.*, 2000).

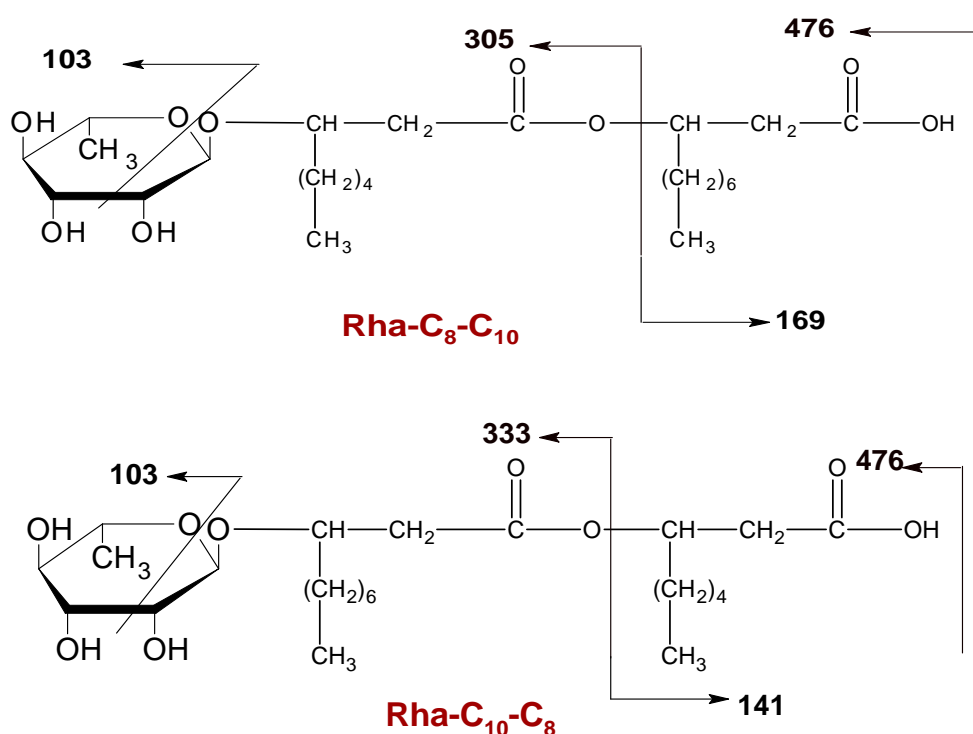


FIGURA 4. FRAGMENTOS PRODUZIDOS POR DOIS HOMÓLOGOS DE RAMNOLIPÍDEOS COM A MESMA MASSA MOLAR

Os homólogos geram fragmentos com m/z diferentes após serem submetidos a ESI-MS e fragmentação em câmara de colisão e análise de MS-MS. O diferente posicionamento das cadeias de ácidos graxos β -hidroxilados causa a diferença na relação m/z dos fragmentos gerados. Fonte: Monteiro *et al.* (2007).

A união das duas técnicas, utilizando a CLAE para separar os diferentes homólogos que compõem a mistura, e a técnica de ESI-MS para elucidar a composição estrutural, é a metodologia que permite a melhor separação e a identificação do maior número de

homólogos. Mais de 28 homólogos de ramnolipídeos foram identificados utilizando este método (DEZIEL *et al.*, 1999).

Outros autores relatam a separação e identificação de misturas contendo 14 (HABA *et al.*, 2003), 11 (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008) 12 (MONTEIRO *et al.*, 2007), e 7 homólogos (ABALOS *et al.*, 2001). Muitas vezes análises de RMN são utilizadas, objetivando confirmar as estruturas propostas nas análises de massa (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2007).

2.4. Propriedades físico-químicas de ramnolipídeos

Os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* são capazes de diminuir tanto a tensão interfacial da água contra o hexadecano para 1 mN/m (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986), quanto a tensão superficial da água (72 mN/m) para valores entre 25-30 mN/m (DESAI & BANAT, 1997). Essas propriedades podem variar em função dos diferentes homólogos produzidos, conforme já mencionado anteriormente (TABELA 2), tornando-os mais ou menos eficientes, dependendo da aplicação desejada. Por exemplo, biossurfactantes que diminuem a tensão superficial com menores valores de CMC são preferíveis de um ponto de vista econômico; entretanto, para estudos de biorremediação utilizando consórcios microbianos, alguns destes biossurfactantes podem exercer efeitos tóxicos aos microrganismos quando se acumulam em valores muito acima de sua CMC (WHANG *et al.*, 2008), ou podem tornar indisponíveis os substratos hidrofóbicos, devido ao seu aprisionamento nas micelas.

Os monoramnolipídeos são em geral mais eficientes na solubilização de compostos hidrofóbicos, por apresentarem maior caráter apolar e menores valores de CMC. Entretanto, em uma posterior etapa de mineralização, a presença do composto hidrofóbico solubilizado mais fortemente nas micelas de monoramnolipídeos prejudica o acesso dos microrganismos a estes compostos (ZHANG *et al.*, 1997). Sendo assim, o uso de dirramnolipídeos se torna favorável se o objetivo de sua aplicação for, não só a remoção de contaminantes hidrofóbicos, mas também sua posterior mineralização. Pode-se concluir, dessa forma, que a degradação de contaminantes hidrofóbicos resulta de uma combinação entre sua solubilização e sua posterior disponibilidade dentro das micelas do surfactante. Como ressaltado anteriormente, os

ramnolipídeos são produzidos como uma mistura de homólogos muito semelhantes, o que muitas vezes dificulta a separação de quantidades individuais de cada um dos componentes para posteriores estudos de aplicação. Além disso, o custo do processo de separação dos homólogos é proibitivo para viabilizar a sua aplicação na indústria. Por outro lado, a mistura de homólogos pode possuir propriedades físico-químicas que favoreçam aplicações ambientais, propriedades estas que serão resultado da composição estrutural de cada homólogo presente e da proporção que cada um deles representa na mistura (ABALOS *et al.*, 2001). Por exemplo, valores de CMC de 110 mg/L são reportados para o homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₀, enquanto que uma mistura contendo 60% de Rha₂-C₁₀-C₁₀ e 20% de Rha-C₁₀-C₁₀ apresenta uma CMC de apenas 53 mg/L (ABALOS *et al.*, 2001; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999). Camilios Neto *et al.*, (2009), para o mesmo organismo do presente trabalho, mas utilizando a técnica de fermentação sólida, separou os grupos de homólogos de mono e dirramnolipídeos por meio de cromatografia FLASH em coluna de sílica gel 60 e encontrou valores de CMC de 31,7 mg/L para uma mistura contendo apenas homólogos de monorramnolipídeos, valor menor que o apresentado pela mistura contendo os monorramnolipídeos e seus correspondentes dirramnolipídeos (48,3 mg/L) e que a mistura contendo apenas dirramnolipídeos (58,9 mg/L).

O comprimento das cadeias de ácidos graxos e a presença de insaturações nessas cadeias também influenciam nas propriedades físico-químicas. O aumento do comprimento da cadeia carbônica contribui para o aumento do caráter apolar da molécula, favorecendo menores valores de CMC, enquanto que a presença uma ou mais insaturações nessa cadeia carbônica altera a conformação das moléculas que formam as micelas, interferindo negativamente na CMC, ou seja, acarretando aumentos nos valores desse parâmetro (HABA *et al.*, 2003; ABALOS *et al.*, 2001; MATA-SANDOVAL, *et al.*, 1999).

Outro indicador comumente utilizado para medir a atividade surfactante é o índice de emulsificação, que é definido como a capacidade da solução contendo o biossurfactante, ou uma mistura de biossurfactantes, de solubilizar diferentes hidrocarbonetos. O índice de emulsificação (*E*) é obtido medindo-se a altura da camada emulsionada (cm) após um determinado tempo, dividindo-se pela altura total do líquido e multiplicando-se por 100 (COOPER & GOLDEMBERG, 1983). Alguns valores de *E*₂₄ (índice de emulsificação após 24h) encontrados para diferentes hidrocarbonetos estão listados na TABELA 5.

TABELA 5. ÍNDICES DE EMULSIFICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR DIFERENTES CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* OBTIDOS FRENTE A DIFERENTES HIDROCARBONETOS

Microrganismo	E_{24} Diesel	E_{24} Gasolina	E_{24} Querosene	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	64	60	65	Monteiro <i>et al.</i> , 2007.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	nd	nd	50	Benincasa & Accorsini, 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM1	74	nd	71	Wu <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	nd	nd	92	Costa <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DHT2	66	47	56	Kumar <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	nd	35	15	Rocha <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	nd	nd	71	Nitschke <i>et al.</i> , 2005

nd: não determinado

2.5. Aplicações dos Biossurfactantes

Praticamente todos os surfactantes químicos utilizados na indústria são sintetizados a partir do petróleo (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998), o que os torna ecologicamente nocivos. Em primeiro lugar, por serem originados a partir de uma fonte não renovável, e em segundo lugar, devido a fatores como toxicidade do surfactante aos microrganismos presentes no ambiente, diminuindo assim as taxas de biodegradação de possíveis contaminantes por estes microrganismos (CHRISTOFI & IVSHNA, 2002). Por outro lado, os biossurfactantes possuem diversas vantagens, pois são não tóxicos ao ambiente e são biodegradáveis, sendo compatíveis com os ciclos biogeoquímicos (HABA *et al.*, 2000). O grande obstáculo que torna os biossurfactantes incapazes de competir comercialmente com os surfactantes químicos é o seu alto custo de produção (PATEL & DESAI, 1997), o que estimula o desenvolvimento de pesquisas para reduzir estes custos.

Os surfactantes podem ser utilizados em praticamente todos os setores da indústria moderna (TABELA 6) (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998), pois sua natureza anfipática confere a eles a propriedade de formar microemulsões, possibilitando a solubilização de compostos hidrofóbicos em água. Devido a isto, suas aplicações são diversas, tais como emulsificantes em indústrias de alimentos e de cosméticos (KIM *et al.*, 1997), componentes

de produtos domésticos e industriais de limpeza, e aditivos na indústria de construção civil e do petróleo (SALAGER, 2002).

Os biossurfactantes podem ser utilizados em todos estes segmentos citados acima, mas sua compatibilidade ecológica faz com que sejam especialmente apropriados para o uso em processos que envolvem a dispersão de surfactantes no meio-ambiente, tais como a biorremediação de solos e aquíferos contaminados por compostos recalcitrantes hidrofóbicos (BONILLA *et al.*, 2005), em recuperação melhorada de petróleo (MEOR), e como agentes de controle biológico, no combate a doenças e pragas (TABELA 6) (NIELSEN *et al.*, 1999).

O uso de biossurfactantes em processos de remoção de compostos lipídicos, tais como hidrocarbonetos voláteis, óleos vegetais, resíduos da indústria petrolífera e outros contaminantes presentes em solos ou efluentes, possui inúmeras vantagens em relação ao uso de surfactantes químicos. A primeira, que já foi ressaltada anteriormente, é a biodegradabilidade dos biossurfactantes, que os torna compatíveis ecologicamente. A segunda é que, para que os contaminantes hidrofóbicos presentes no solo passem para o interior das micelas ou das vesículas formadas pelo surfactante, é necessário que este esteja em concentrações acima de sua CMC (KUYUKINA *et al.*, 2005), que é geralmente menor para os biossurfactantes, em comparação aos surfactantes químicos. Além disso, na maioria das vezes, os surfactantes químicos apresentam efeitos inibitórios sobre a comunidade microbiana degradadora quando utilizados na sua CMC ou em valores superiores (WHANG *et al.*, 2008).

TABELA 6. BIOSSURFACTANTES E RAMOS INDUSTRIAIS DE APLICAÇÃO

Ramo industrial	Aplicação	Função do Biossurfactante
Petróleo	Recuperação Melhorada de Petróleo (MEOR)	Redução da viscosidade de óleos, recuperação de óleo residual
	Desemulsificante	Quebra de emulsões, solubilização, redução da viscosidade, agente umectante
	Remediação <i>Soil washing</i> , <i>Soil flushing</i>	Emulsificação através da aderência ao hidrocarboneto, dispersante, agente de espuma, detergente
	Ingrediente funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos, agente protetor.
Biológico	Microbiologia	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular
	Farmacêutica	Antibacteriana, antifúngica, antiviral, agentes penetrantes e umectantes
Agricultura	Biocontrole	Facilita mecanismos associados ao microrganismo como parasitismo, competição, resistência sistêmica induzida e hipovirulência
Cosmética		Emulsificantes, agentes de espuma, solubilizadores, umectantes, agentes de limpeza

Fonte: adaptado de Singh *et al.*, (2007).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando as vantagens associadas ao uso de biossurfactantes e a ausência de processos industriais já implantados para a sua produção, principalmente devido ao seu elevado custo, o objetivo geral desta dissertação é estudar o processo de produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e determinar a composição estrutural dos homólogos ao longo do tempo de incubação, na condição otimizada, e suas propriedades físico-químicas.

Objetivos específicos:

Otimizar a produção de ramnolipídeos, por meio de fermentação submersa, tomando por base os resultados indicados pelos experimentos de delineamento fatorial com superfície de resposta realizados anteriormente (MONTEIRO, 2007), variando as relações C/N.

Selecionar os componentes do meio de fermentação que influenciam positivamente na quantidade e nas propriedades físico-químicas da mistura de ramnolipídeos produzida.

Caracterizar, utilizando técnicas cromatográficas e ESI-MS (Espectrometria de Massas acoplada à Ionização por Eletrospray), os compostos com atividade surfactante produzidos na condição otimizada, em diferentes tempos de cultivo.

Determinar as propriedades físico-químicas da mistura de homólogos produzida, relacionando-as, quando possível, com a sua composição molecular e estrutural.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, cepa originalmente isolada de uma planta petroquímica em Canto do Amaro, Rio Grande do Norte, gentilmente cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. Esta cepa já vem sendo utilizada para estudos de produção de biossurfactante no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, Departamento de Química da UFPR (CAMILIOS NETO *et al.*, 2009, 2008; MONTEIRO, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2007; MEIRA, 2007). O microrganismo foi mantido em placas com meio sólido ágar tríptico de soja (TSA) a 4°C, com repicagens mensais.

4.2. Pré - inóculo

O pré-inóculo foi realizado em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio Luria-Bertani (LB), a 30°C e 200 rpm durante o tempo necessário para se atingir uma densidade óptica (D.O.) no comprimento de onda (λ) de 600 nm, igual a 0,8 – 1,0, valor este equivalente a aproximadamente 10^8 células/mL. Uma quantidade pré-determinada desta cultura foi então inoculada em erlenmeyers contendo o meio de fermentação.

4.3. Produção do Biossurfactante

Todos os estudos foram realizados em fermentação submersa. Inicialmente, utilizou-se um meio mineral constituído de: (g/L) 3,0 KH_2PO_4 , 7,0 K_2HPO_4 , 0,2 MgSO_4 , glicerol (concentrações de 30, 60, 90, 120 e 150 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (concentrações de 0,5 g/L e 1 g/L), conforme descrito por Monteiro (2007). O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 min.

4.4. Otimização das condições de produção

Estes experimentos foram realizados para dar continuidade do trabalho realizado por Monteiro (2007), que fez um delineamento fatorial 3^3 incompleto no seu estudo da otimização da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614.

As variáveis estudadas por Monteiro (2007) foram a concentração de glicerol, concentração de fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e concentração de sulfato de ferro (FIGURA 5). Foi atingido um máximo de produção de 12,4 g/L e seus resultados indicaram que um aumento na concentração de glicerol (acima de 30 g/L), por conseqüência, um aumento na relação C/N (área em vermelho na FIGURA 5), poderiam propiciar um aumento da produção de ramnolipídeos. O delineamento também sugeriu que um aumento do tempo de cultivo para acima de 168 h poderia propiciar um aumento da produção de ramnolipídeos.

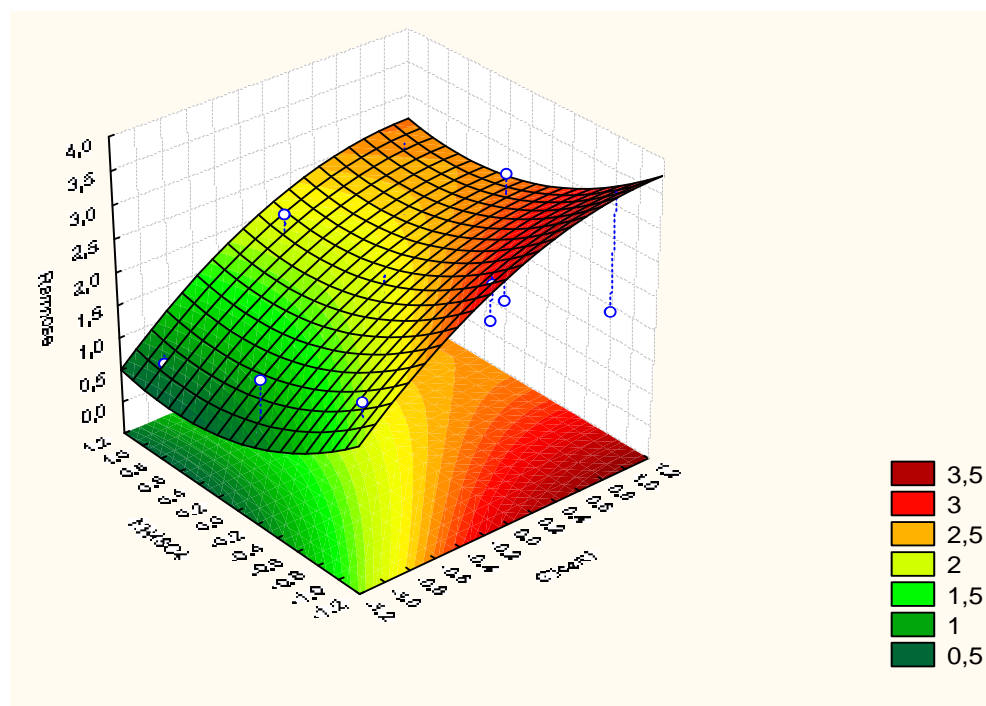


FIGURA 5. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA NOS EXPERIMENTOS DE DELINEAMENTO FATORIAL REALIZADOS POR Monteiro *et al.* (2007)

Inicialmente, foi realizada uma curva de crescimento (FIGURA 6) com o microrganismo. Para tal, a bactéria foi previamente inoculada em meio sólido TSA por 24 h e em seguida as placas foram raspadas e as células ressuspensas em solução salina 0,1% (m/v). Um mililitro desta suspensão de células, contendo 10^8 células/mL (determinada pela

contagem de células em câmara de Neubauer), foi inoculado em meio líquido Luria-Bertani (LB), a 30°C e 200 rpm por 24 h. A cada 2 h, amostras foram retiradas de maneira asséptica, mensurando-se a D.O. a 600 nm e o número de células, utilizando uma câmara de Neubauer. Diluições foram realizadas quando necessário, utilizando água destilada na determinação da D.O. e solução salina 0,1% (m/v) para a contagem de células.

Com o objetivo de analisar a influência do aumento da relação C/N, foram realizados experimentos utilizando o meio de fermentação descrito no item 4.3 com relações carbono/nitrogênio (C/N) de 55 ou maiores, visto que o trabalho de Monteiro (2007) demonstrou que relações C/N menores prejudicam a produção de biossurfactante por este microrganismo. Primeiramente, a concentração de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) foi reduzida de 1,0 g/L (C/N 55, utilizando 30 g/L de glicerol) para 0,5 g/L (C/N 110, também utilizando 30g/L de glicerol).

A próxima variável modificada foi a fonte de carbono. Para tanto, concentrações de 30, 90, e 120 e 150 g/L de glicerol foram adicionadas ao meio de fermentação, rendendo relações C/N de 55, 167, 222 e 278.

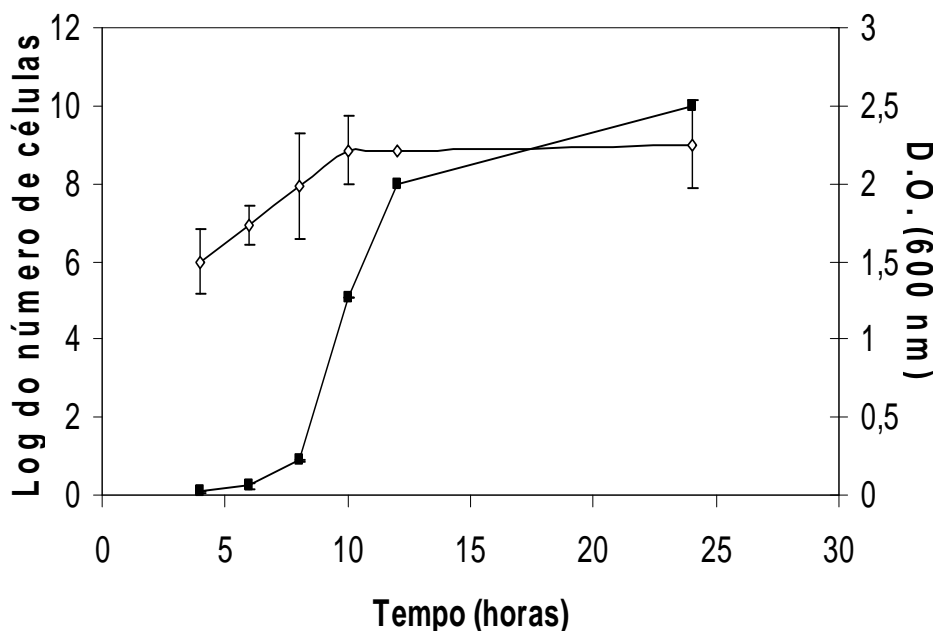


FIGURA 6. CURVA DE CRESCIMENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM MEIO LÍQUIDO LURIA BERTANI (LB)

Legenda: ◊ - contagem de células, ■ - densidade óptica (D.O.). Condições: 30°C e 200 rpm.

Foram realizados experimentos preliminares com aumento da quantidade de inóculo, visando analisar a influência desta variável. Neste caso, a quantidade de inóculo adicionado ao meio de fermentação foi de 2 e 4 % (v/v) (nos experimentos iniciais foi utilizada apenas a concentração de 2%).

Em todos os experimentos descritos acima, as culturas foram mantidas à temperatura de 30°C em agitador orbital (200 rpm), pelo tempo necessário em cada estudo. Para avaliar a cinética da produção dos ramnolipídeos pelo microrganismo, foram retiradas amostras em intervalos de 24, 48 ou 96 h, dependendo do tempo total de cultivo a ser utilizado, sendo que o total de volume retirado nunca excedeu 10% (v/v) do volume total de meio de cultura. Cada amostra coletada foi submetida imediatamente à centrifugação a 8000×g por 30 min, e o sobrenadante isento de células foi utilizado para dosagem de ramnolipídeos. Ao final dos cultivos, o meio restante no frasco erlenmeyer foi centrifugado, sendo o volume de sobrenadante resultante utilizado para análises de tensão superficial (TS) e concentração micelar crítica (CMC).

4.5. Triagem de componentes do meio de fermentação

Tendo por base os trabalhos de Guerra-Santos *et al.*, (1984), Guerra-Santos *et al.* (1986), Oschner *et al.* (1994), Monteiro (2007) e Lang e Wullbrandt (1999) as variáveis do meio de fermentação apresentadas na TABELA 7 foram selecionadas, visando avaliar a sua influência na produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*. Os cultivos foram realizados a 30°C e 200 rpm por sete dias.

TABELA 7. VARIÁVEIS E VALORES SELECIONADOS PARA O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.

Variáveis	Tipos/concentrações
Fonte de nitrogênio	NaNO ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄ e NH ₄ NO ₃
Concentração da fonte de nitrogênio	1, 2 e 5 g/L
Concentração do inóculo	2 e 4% (v/v)
Concentração de glicerol	10, 20, 30 e 40 g/L

4.6. Extração dos ramnolipídeos

As amostras coletadas durante ou após o fim da fermentação foram submetidas, quando necessário, à extração líquido-líquido conforme descrito por Camilios Neto *et al.*, (2008) com algumas modificações, visto que as etapas de extração sólido-líquido não foram necessárias. Após as amostras serem centrifugadas da maneira como descrito no item 4.4., foram submetidas à extração líquido-líquido em funil de separação, utilizando como solvente orgânico clorofórmio-metanol (3:1), sendo a proporção de solvente orgânico utilizado em relação ao volume de sobrenadante de 2:1. Foi adicionado ao sobrenadante uma solução de KCl 15% (m/v), para auxiliar na quebra da emulsão que se forma ao se misturar o sobrenadante contendo os ramnolipídeos e o solvente orgânico. Após a extração, o solvente foi removido sob vácuo em evaporador rotatório à temperatura de 35°C. As amostras resultantes foram secas em estufa a 60°C, obtendo-se ao final uma mistura dos ramnolipídeos (de coloração variando do marrom ao amarelo), juntamente com a piocianina, um pigmento de coloração azul-esverdeada produzido por *P. aeruginosa* (HASSET *et al.*, 1992).

4.7. Métodos Analíticos

4.7.1. Determinação do crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da D.O. no meio de cultivo em espectrofotômetro UV-240 IPC, Shimadzu, no comprimento de onda (λ) de 600 nm, conforme descrito no item 4.4. Paralelamente, o crescimento foi avaliado por gravimetria, determinado-se o peso seco da amostra, sendo que, neste caso, 2 mL do meio de fermentação foram coletados e centrifugados ($8000\times g$, 20 min), lavados com solução de NaCl 0,9% (m/v), e centrifugados novamente. Feito isso, as amostras foram submetidas a aquecimento em estufa a 80 – 100°C até peso constante. As análises foram realizadas em duplicata.

4.7.2. Determinação da tensão superficial (TS)

A medida da tensão superficial foi realizada nas amostras purificadas utilizando-se o tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12 (Hamburgo, Alemanha), equipamento disponível no Departamento de Física da UFPR. A metodologia utilizada nas análises foi o método de Du Nouy do anel, utilizando um anel de platina. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. Uma força adicional é exercida sobre o anel no momento no qual a lâmina do líquido vai se romper, e é então determinada a tensão superficial (Krüss, 1994).

As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises medindo-se a tensão superficial da água destilada (em média, 72mN/m).

4.7.3. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC foi calculada diluindo o meio de cultura isento de células com igual volume de água destilada, segundo técnica descrita por Sheppard e Mulligan (1987). Após feitas tais diluições, foi realizada a medida da tensão superficial das amostras e foi construído um gráfico da tensão superficial contra diferentes concentrações de açúcares totais, expressas em

ramnose, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. As medidas de tensão superficial foram determinadas até que os valores obtidos se aproximaram da tensão superficial da água destilada.

4.7.4. Medida do Índice de Emulsificação (E_{24})

O índice de emulsificação (E_{24}) foi realizado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio, foram distribuídos 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, gasolina e diesel) e, posteriormente, adicionou-se 4 mL de sobrenadantes obtidos do meio de cultivo após centrifugação a $8000\times g$ ou de soluções contendo os ramnolipídeos extraídos. Cada tubo foi, então, submetido a vórtex (rotação máxima) por 2 min e mantido em repouso por 24 h. O índice E_{24} foi determinado medindo-se a altura da camada emulsionada (cm), dividindo-se pela altura total do líquido e multiplicando-se por 100 (Equação 1). As análises foram todas realizadas em duplicata.

$$E_{24} = \frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \times 100$$

(Equação 1)

4.7.5. Quantificação dos ramnolipídeos

A quantificação indireta de ramnolipídeos foi realizada pela medida de açúcares totais pelo método de Dubois *et al.*, (1956). A metodologia consistiu na adição de 0,5 mL do sobrenadante de cultura livre de células em tubo de vidro de 20 mL, seguido da adição de 0,5 mL de solução de fenol 5% (m/v), mais 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex e deixada em repouso por 15 min. Após esse período, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 480 nm contra a água destilada. As análises foram todas realizadas em triplicata.

A curva de ramnose foi construída utilizando-se uma solução estoque de ramnose (Sigma-Aldrich) padrão com 0,936 mg/mL. A partir desta solução foram preparadas diluições correspondentes às concentrações (mg/L) de 15, 30, 45, 60 e 90 em balões volumétricos de 10 mL. A seguir, 1 mL de cada diluição foi adicionado em tubos e a dosagem de açúcares totais

por ramnose foi realizada conforme descrita anteriormente. A FIGURA 7 mostra a curva padrão de ramnose (mg/L).

Salvo quando houver indicação em contrário, os valores obtidos nas determinações de ramnose foram convertidos para ramnolipídeos utilizando-se de um fator de conversão de 3,2, conforme descrito por Camilios Neto *et al.*, (2008). Este fator de conversão representa uma média dos valores citados na literatura.

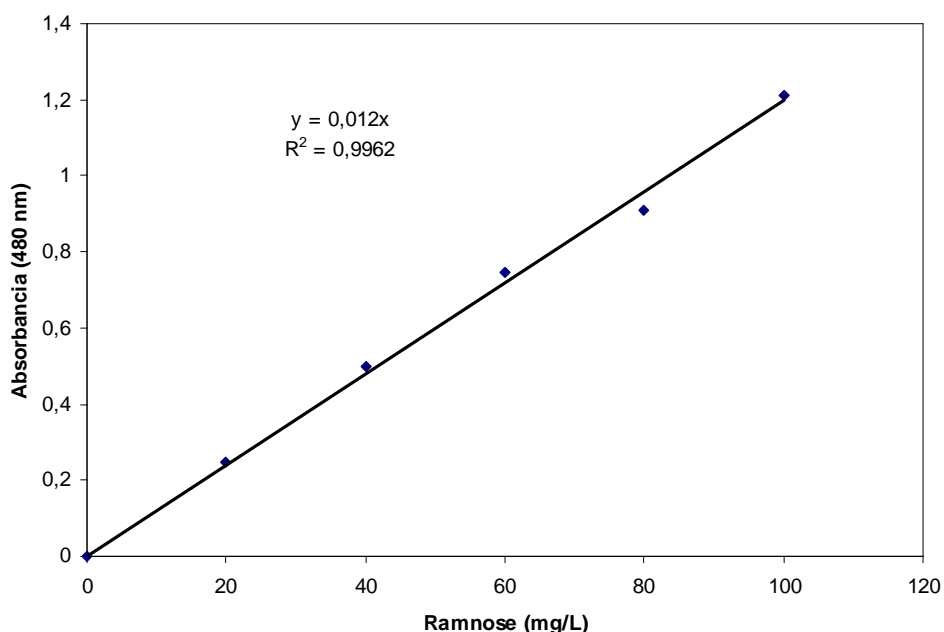


FIGURA 7. CURVA PADRÃO DE AÇÚCARES TOTAIS POR RAMNOSE (mg/L), CONSTRUÍDA UTILIZANDO O MÉTODO DE Dubois *et al.* (1956)

4.7.6. Quantificação do glicerol

A metodologia utilizada na quantificação do glicerol foi a proposta por Soloni (1971), com algumas modificações (MOURA, 1998). O método baseia-se no seguinte princípio: o glicerol é oxidado a formaldeído, pelo metaperiodato de sódio. O formaldeído resultante reage com acetilacetona, em presença de amônia, formando um complexo de cor amarela (3,5-diacetil-1,4 diidrolutidina), que é medido fotometricamente no comprimento de onda de 410 nm (FIGURA 8). Para que esta dosagem fosse realizada nas amostras com um mínimo de interferência, a metodologia foi adaptada de acordo com o apresentado por Sasaki *et al.*, (2001). Devido à alta sensibilidade do método, as determinações foram realizadas utilizando-

se de diluições seriadas, visando minimizar os erros. As análises foram realizadas em triplicata.

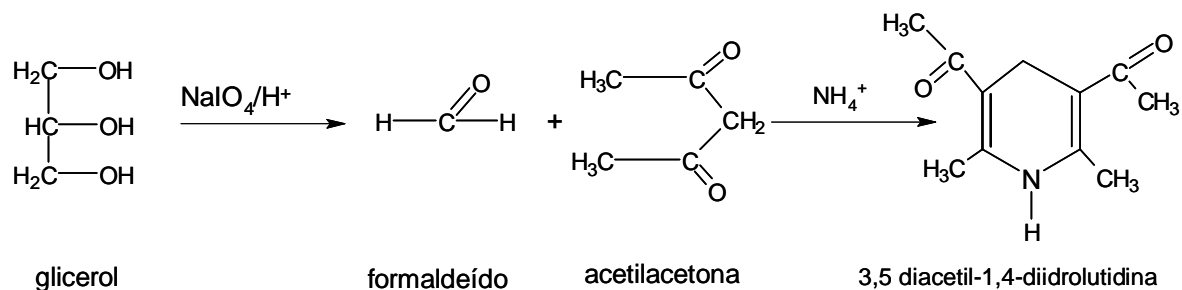


FIGURA 8. REAÇÃO QUÍMICA DO GLICEROL COM FORMALDEÍDO FORMANDO O COMPLEXO COLORIMÉTRICO 3,5-1,4-DIIDROLUTIDINA (410 nm), PELO MÉTODO DE Soloni (1971)

O procedimento utilizado nas determinações foi o seguinte: de uma solução padrão de glicerol (3,0 g diluída em 100 mL de água destilada) foram retirados 0,5 mL, que foram diluídos novamente com 14,5 mL de água. Esta solução foi utilizada para se preparar as amostras com concentrações que variaram de 10 a 50 µg/mL. Preparadas as diluições, amostras de 1 mL de cada concentração foram vertidas em tubos de ensaio, onde adicionou-se 1 mL de solução de metaperiodato de sódio (65 mg de NaIO₄ dissolvidos em 90 mL de água destilada, adicionados de 10 mL de ácido acético e 7,7 g de acetato de amônio) e 2,5 mL de uma solução contendo acetilacetona (2,5 mL dissolvidos em 247,5 mL de isopropanol). A mistura foi agitada em vórtex e incubada em banho-maria a 50°C durante 20 min, resultando em um complexo amarelo que absorve luz em 410 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão de glicerol (FIGURA 9).

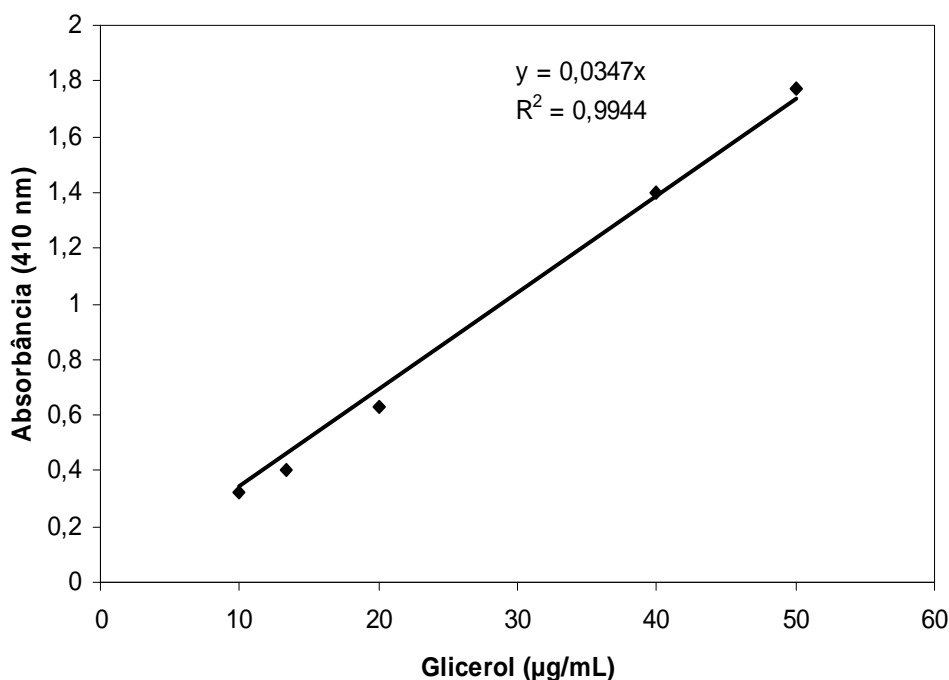


FIGURA 9. CURVA-PADRÃO DE GLICEROL, CONSTRUÍDA UTILIZANDO-SE O MÉTODO COLORIMÉTRICO-QUÍMICO DE Soloni (1971)

4.7.7. Espectrometria de massas acoplada à ionização por eletrospray

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massa (Laboratório de Química de Carboidratos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR) do tipo triplo quadrupolo (Quattro LC – Micromass, Manchester, UK) no modo de íon negativo. As amostras foram extraídas da forma como descrita no item 4.6. e solubilizadas em metanol, sofrendo posteriormente as diluições adequadas, realizadas com água deionizada, de modo a se obter concentrações entre 0,2 e 0,5 mg/L. As amostras foram injetadas por infusão direta, por bomba de infusão, obtendo-se um fluxo da ordem de 10 µL/min. As condições de análise foram: energia do capilar de 2,45 kV, e energia do cone de 43 V. Para aquisição dos espectros, utilizou-se uma faixa de m/z de 200 a 800. As abundâncias relativas (%) da mistura de ramnolipídeos foram calculadas pela integração da intensidade relativa de seus correspondentes íons pseudomoleculares.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Influência da relação carbono-nitrogênio na otimização das condições de produção de ramnolipídeos

5.1.1. Aumento da relação carbono-nitrogênio pela diminuição da quantidade de nitrogênio

Com o objetivo de observar se o aumento da relação C/N influenciaria positivamente na produção de ramnolipídeos, foram realizados experimentos com relações C/N de 55 e de 110. Para isso, manteve-se constante a concentração de fonte de carbono (glicerol, 30 g/L) e variou-se a concentração de sulfato de amônio (1,0 g/L para a relação C/N de 55 e 0,5 g/L para a relação C/N de 110). Os resultados estão mostrados na FIGURA 10.

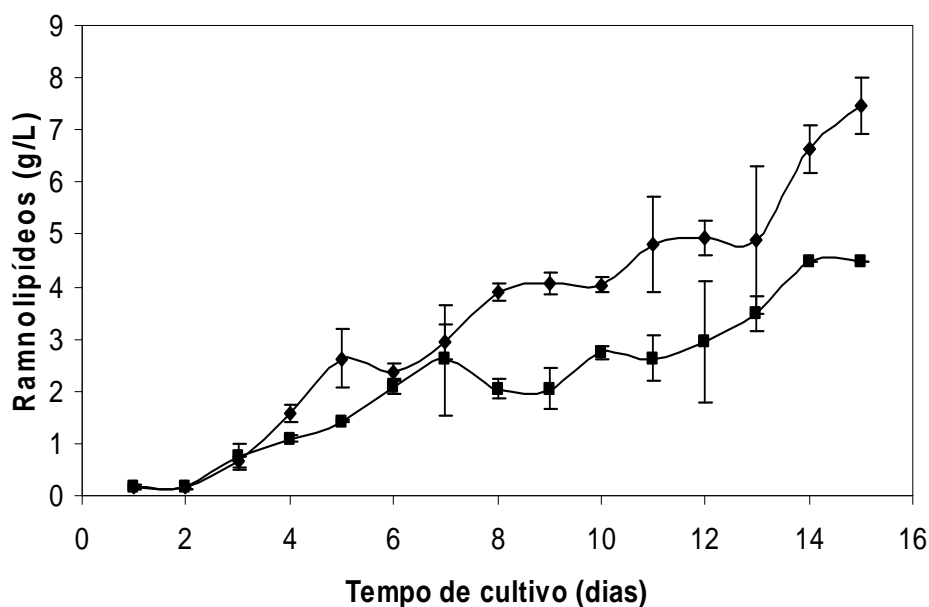


FIGURA 10. EFEITO DA RELAÇÃO CARBONO-NITROGÊNIO (C/N) NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Legenda: ◆ - C/N 55 e ■ - C/N 110. Fonte de carbono: glicerol (30 g/L). Condições 30°C, 200 rpm.

Observou-se (FIGURA 10) que, até os primeiros seis dias do experimento, as curvas apresentaram perfis similares; porém, a partir daí, ocorreu uma maior produção de ramnolipídeos para a relação C/N 55, atingindo-se 7,4 g/L ao final do cultivo (15 dias), que corresponde a um valor 40% maior em comparação com a condição que utilizou a relação C/N de 110. Mesmo que este valor final de produção de ramnolipídeos (7,4 g/L) seja menor do que o obtido por Monteiro (2007), que obteve um máximo de 12,4 g/L em 9 dias, estes experimentos mostram que provavelmente não se pode utilizar relações C/N superiores a 55. Neste caso, o teor de nitrogênio mais baixo (0,5 g/L de sulfato de amônio) pode não ter sido suficiente para promover o crescimento do microrganismo, prejudicando assim a produção de ramnolipídeos. Estes resultados mostraram que, no que se refere à relação C/N, o delineamento fatorial realizado por Monteiro (2007) atingiu a condição ótima em C/N 55, utilizando glicerol (30 g/L) como fonte de carbono e sulfato de amônio (1 g/L) como fonte de nitrogênio para produção de ramnolipídeos. Por outro lado, a indicação do aumento do tempo de cultivo para maior produção dos ramnolipídeos obtida no delineamento de Monteiro (2007), que interrompeu os cultivos depois de 9 dias, provou ser verdadeira, sendo que até o tempo de 360 h (15 dias) a quantidade de ramnolipídeos continuou aumentando.

5.1.2. Aumento da relação carbono-nitrogênio pelo aumento da concentração da fonte de carbono (glicerol)

Para explorar o efeito da variação das concentrações de glicerol no meio, sem alteração da concentração da fonte de nitrogênio, foram realizados os experimentos descritos a seguir. Variou-se a concentração de glicerol de 30 para 150 g/L, mantendo-se a concentração de sulfato de amônio em 1 g/L, obtendo-se relações C/N de 55 (30 g/L de glicerol), 167 (90 g/L de glicerol), 222 (120 g/L de glicerol) e 278 (150 g/L de glicerol). Os cultivos foram acompanhados por 7 dias.

Como pode ser visto na FIGURA 11, a maior produção ocorreu quando se utilizou 30 g/L de glicerol (C/N 55), a mesma condição otimizada por Monteiro (2007), ou seja, o aumento da concentração de glicerol para valores maiores que 30 g/L foi prejudicial à síntese de ramnolipídeos. A produção de ramnolipídeos nos experimentos com concentrações de 90, 120 e 150 g/L decresceu em aproximadamente de 20% de uma condição para outra. O uso de concentrações de glicerol acima de 30 g/L não promoveu aumento na produção, provavelmente porque altas concentrações de glicerol no meio, devido à sua maior

viscosidade, limitaram a transferência de oxigênio (efeito difusional), prejudicando o crescimento do microrganismo e a produção do biossurfactante, conforme já verificado nos experimentos anteriores. Estes experimentos mostram que, de fato, o que prejudica a produção de biossurfactantes é o efeito difusional causado pelo excesso de glicerol no meio, pois a concentração da fonte de nitrogênio foi mantida constante nos experimentos.

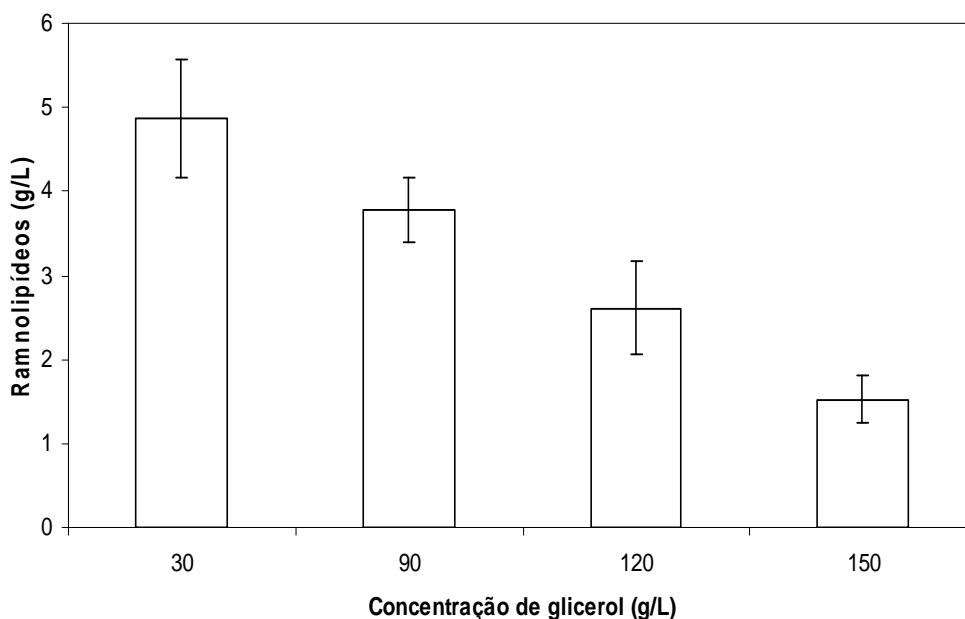


FIGURA 11. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Fonte de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L). Condições: 30°C, 200 rpm, 7 dias.

Resultados similares foram apresentados por Guerra-Santos *et al.*, (1986). Neste estudo, a maior produção de ramnolipídeos (1,5 g/L) foi alcançada utilizando como fonte de carbono a glicose na concentração de 73 g/L, sendo que o aumento da concentração para 98 g/L foi extremamente prejudicial, causando diminuição da quantidade de ramnolipídeos no meio que, segundo os autores, também foi causado por problemas difusionais.

Como já mostrado anteriormente na revisão da literatura, não existe consenso no efeito da relação C/N na produção de ramnolipídeos, que pode ser dependente da cepa, das fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas. Por exemplo, relações C/N maiores que 18 diminuiriam drasticamente a produção de ramnolipídeos quando a glicose foi utilizada como fonte de

carbono, na concentração de 18 g/L (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984). Uma relação C/N ótima de 26 foi encontrada quando *P. aeruginosa* EM1 foi cultivada em um meio contendo 40 g/L de glucose como fonte de carbono, sendo que relações C/N maiores que 52 afetaram drasticamente o rendimento de ramnolipídeos, que chegou a apresentar um decréscimo de 95% com uma relação C/N de 133; quando a fonte de carbono utilizada foi o glicerol, a melhor relação C/N foi de 52, sendo que novamente o aumento da relação C/N para 133 foi extremamente prejudicial para a produção de ramnolipídeos (WU *et al.*, 2008). Estes dados estão de acordo com os apresentados nas FIGURAS 10 e 11. Embora seja um fato conhecido que a produção de ramnolipídeos seja estimulada por condições de limitação de nitrogênio (BENINCASA *et al.*, 2002; MULLIGAN & GIBBS, 1989), os resultados apresentados sugerem que pode estar ocorrendo um possível efeito inibitório no metabolismo da bactéria, devido a uma provável deficiência no transporte de oxigênio e de nutrientes.

5.1.3. Efeito da concentração do inóculo

Diante dos resultados obtidos nos experimentos de aumento da relação C/N realizados anteriormente, no próximo experimento foram estudadas a concentração inicial do inóculo (2 e 4%, v/v) e a concentração de glicerol (30 e 60 g/L), visando avaliar se ocorrem interações entre estes dois fatores que resultassem em aumento da produção de ramnolipídeos.

Os melhores resultados (FIGURA 12), foram obtidos quando se utilizou 2% (v/v) de inóculo e 30 g/L de glicerol ou 4% inóculo e 60 g/L de glicerol (10,5 g/L, 21 dias), sendo que a condição com 4% inóculo e 30 g/L de glicerol apresentou um valor ligeiramente superior (11,2 g/L). Um aumento apenas na concentração de glicerol para 60 g/L novamente resultou em menor produção de ramnolipídeos (8,0 g/L), quando comparada às outras condições testadas, resultados esses que estão de acordo com os apresentados na FIGURA 11.

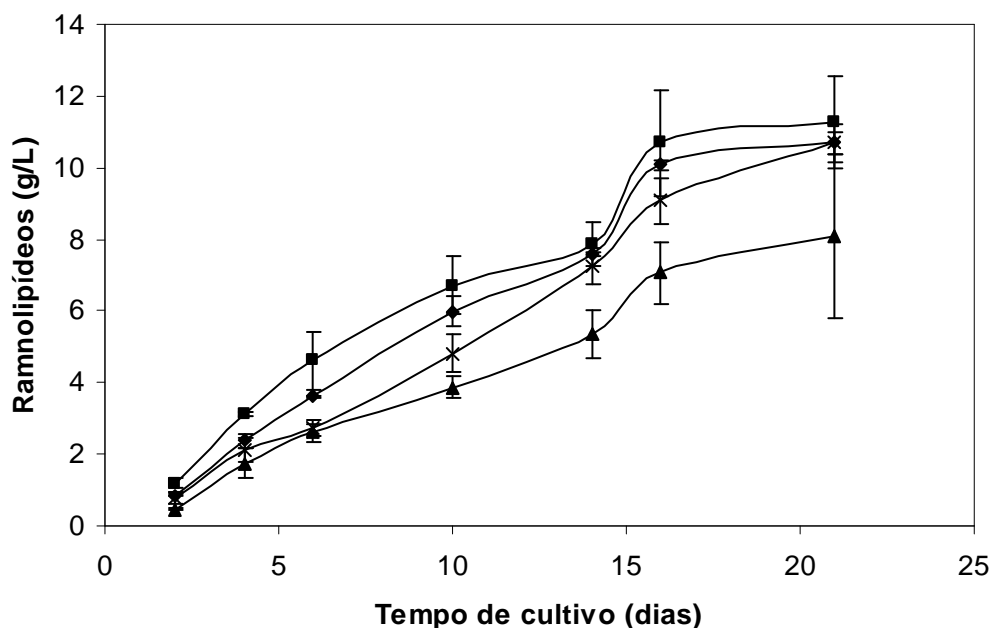


FIGURA 12. EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E DO TEOR DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Legenda: 2% inóculo e 30 g/L glicerol (◆), 4% inóculo e 30 g/L glicerol (■), 2% inóculo e 60 g/L glicerol (▲) e 4% inóculo 60 g/L glicerol (×). Condições: 30°C e 200 rpm.

5.2. Triagem dos componentes do meio de fermentação

Diante dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, que tinham como objetivo explorar as informações obtidas com o delineamento fatorial realizado por Monteiro (2007), que apontavam para uma maior produção de ramnolipídeos com o aumento da razão C/N, e que mostraram que o aumento dessa relação no meio é prejudicial para produção de ramnolipídeos, foi estudado o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (NaNO_3 e NH_4NO_3). Além disso, como variaram os meios de cultura, foram estudados novamente os efeitos das concentrações de inóculo e de glicerol para as novas condições. Para viabilizar a execução dos experimentos e sabendo-se que a evolução da produção de ramnolipídeos é diretamente proporcional ao tempo de cultivo, optou-se por tempos de cultivo menores (sete ou oito dias). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2.1. Efeito da fonte de nitrogênio

Na FIGURA 13 pode-se constatar que NaNO_3 e NH_4NO_3 apresentaram resultados ligeiramente melhores (6,2 g/L) em relação ao rendimento de ramnolipídeos quando comparados ao sulfato de amônio (condição padrão, 5,5 g/L). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Arino *et al.*, (1996) que investigaram a influência do nitrato de sódio e do sulfato de amônio (ambos na concentração de 5 g/L) na produção de ramnolipídeos, obtendo 11,2 g/L e 4,48 g/L para 7 dias de cultivo para nitrato de sódio e o sulfato de amônio, respectivamente. Sendo assim, estas duas fontes foram escolhidas para serem utilizadas nas fermentações posteriores.

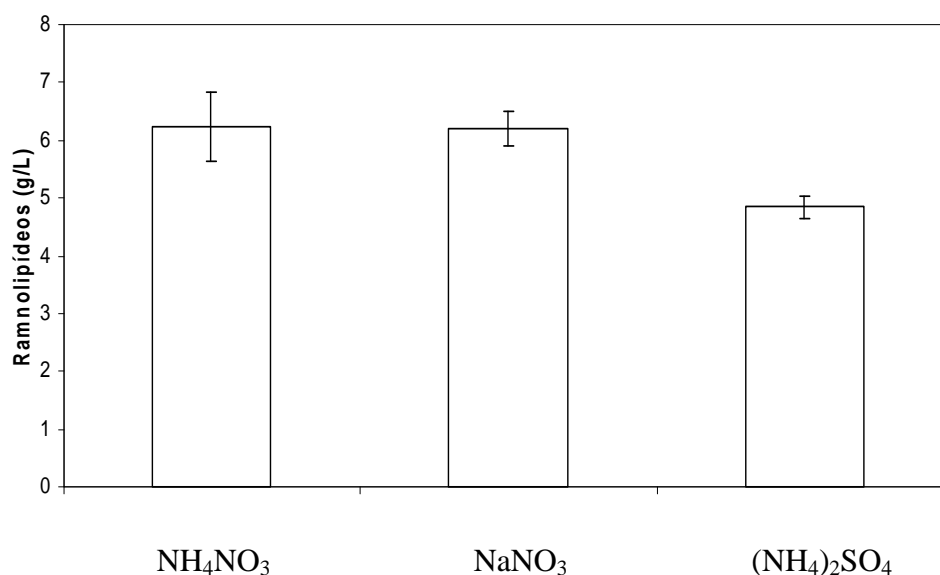


FIGURA 13. EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Fonte de carbono: glicerol 30 g/L. Fontes de nitrogênio: NH_4NO_3 (0,5 g/L), NaNO_3 (1,0 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L). Condições: 30°C, 200 rpm, 7 dias.

5.2.2. Efeito combinado da concentração de inóculo e da fonte de nitrogênio

No próximo bloco de experimentos foram utilizadas as fontes de nitrogênio NaNO_3 e NH_4NO_3 , mantendo-se o glicerol na concentração de 30 g/L, e variando-se a concentração de

inóculo adicionado ao meio (2 e 4%, v/v). Os resultados obtidos (FIGURA 13) permitem concluir que o uso de uma concentração de inóculo de 4% (v/v) e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio proporcionou uma maior produção de ramnolipídeos (6,0 g/L).

A maioria dos relatos existentes (ABOUSEOUD *et al.*, 2008; RAZA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2006) não investiga a influência da variável concentração de inóculo na produção final de ramnolipídeos. O volume de inóculo utilizado, quando relatado, é quase sempre de 2% (v/v), com exceção dos trabalhos de Wu *et al.*, (2008) e Benincasa & Accorsini (2008), onde se utilizou um volume de inóculo de 5%, que não ocasionou aumento significativo na produção de ramnolipídeos (7,3 e 12,6 g/L, respectivamente). Com base nestes resultados, nitrato de sódio foi selecionado como fonte de nitrogênio para os experimentos posteriores, além do volume de inóculo ter sido fixado em 4% (v/v).

5.2.3. Concentração da fonte de nitrogênio

Estabelecida a fonte de nitrogênio a ser utilizada, foi testado o efeito da sua concentração na produção de ramnolipídeos. Como pode ser observado na FIGURA 13, a concentração mais efetiva dentre as estudadas foi a de 5 g/L, o que está de acordo com o trabalho de Arino *et al.* (1996), onde a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* GL1 aumentou significativamente quando concentrações de até 5 g/L de nitrato de sódio foram utilizadas, (obtendo-se 18,5 g/L de ramnolipídeos com 8 dias de cultivo, sendo que concentrações maiores diminuíram a produção. Abalos *et al.*, (2002) obtiveram uma produção final de 18,7 g/L de ramnolipídeos quando *P. aeruginosa* AT 10 foi cultivada em um meio de fermentação onde a concentração de NaNO₃ no meio era de 4,6 g/L, muito próxima à concentração (5 g/L) que promoveu a melhor produção final de ramnolipídeos (13,6 g/L), mostrada na FIGURA 15. Sendo assim, esta foi a concentração utilizada nos experimentos posteriores.

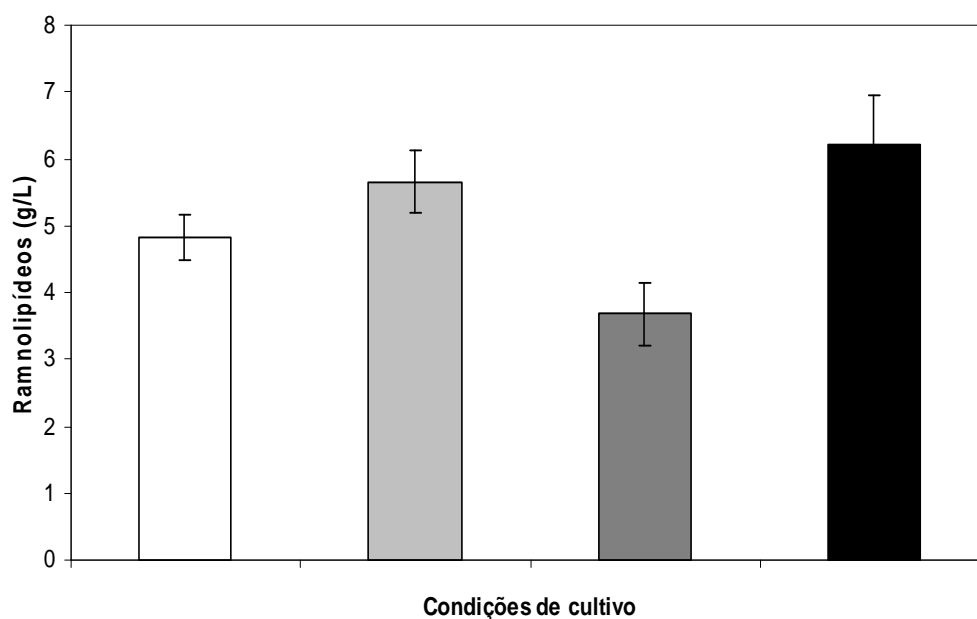


FIGURA 14. EFEITO DAS VARIÁVEIS CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Legenda: 4% inóculo e nitrato de sódio (■), 4% inóculo e nitrato de amônio (■), 2% inóculo e nitrato de sódio (■), e 2% inóculo e nitrato de amônio (□). Fonte de carbono: glicerol (30 g/L). Condições: 30°C, 200 rpm, 8 dias.

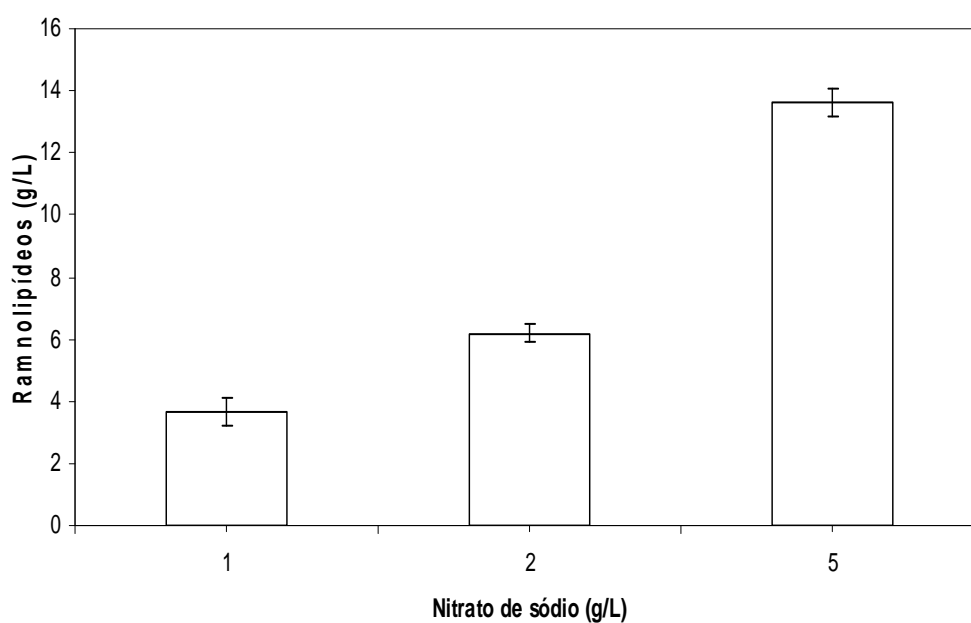


FIGURA 15. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO DE SÓDIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Fonte de carbono: glicerol (30 g/L). Condições: 30°C, 200 rpm, 7 dias.

5.2.4. Efeito da concentração de glicerol

Estabelecidas as concentrações de nitrato de sódio e de inóculo que proporcionaram os melhores resultados, estas foram fixadas e variou-se a concentração de glicerol adicionado ao meio. Como pode ser observado na FIGURA 16, a melhor produção de ramnolipídeos foi de 15,0 g/L após 7 dias de cultivo, quando foram utilizados 40 g/L de glicerol.

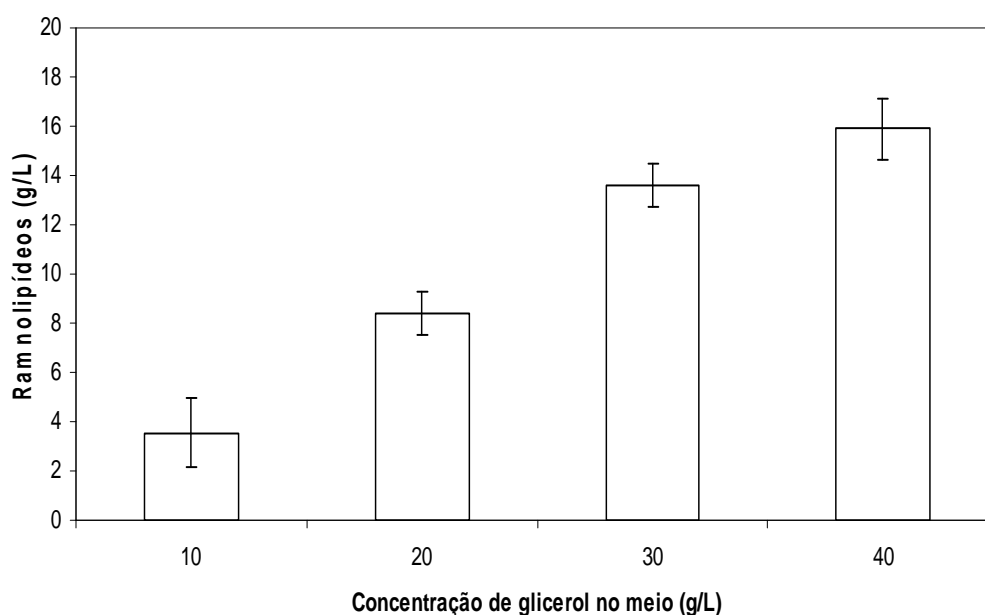


FIGURA 16. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Fonte de nitrogênio: NaNO_3 (5g/L). Condições: 30°C, 200 rpm, 7 dias.

5.3. Cinética de produção de ramnolipídeos

A FIGURA 17 mostra a cinética de produção de ramnolipídeos, o consumo de glicerol e biomassa microbiana produzida utilizando as condições selecionadas no item 5.2. Analisando-se a FIGURA 16, pode-se constatar que a produção de ramnolipídeos apresenta-se em forma crescente do segundo ao quarto dia de cultivo, sendo que no quarto dia essa produção sofre uma desaceleração, que coincide com o esgotamento do conteúdo de glicerol

no meio. Em relação à biomassa, verifica-se que o microrganismo diminui sua velocidade de crescimento também no quarto dia, entrando em fase de declínio a partir do quinto dia.

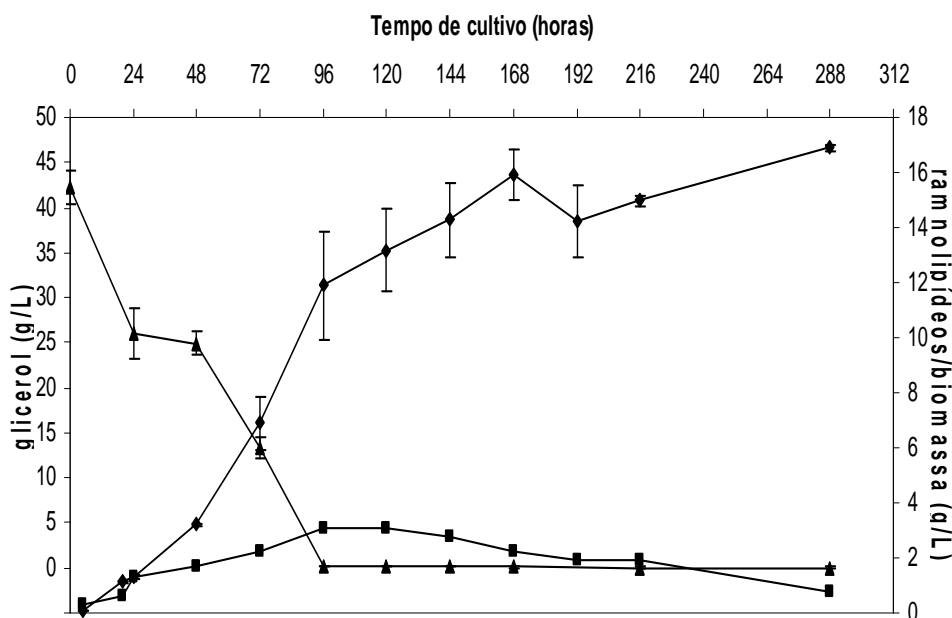


FIGURA 17. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Legenda: produção de ramnolipídeos (◆), consumo de glicerol (▲), e crescimento (biomassa) (■). Inóculo 4% (v/v), fonte de nitrogênio: NaNO_3 (5 g/L), fonte de carbono: glicerol (40 g/L). Condições: 30°C e 200 rpm.

Tendo por base os dados apresentados na FIGURA 17, a TABELA 8 foi montada. Nela, os melhores resultados são comparados com a condição de fermentação desenvolvida por Monteiro (2007). Observa-se que a condição anterior da fermentação rendeu um coeficiente $Y_{p/s}$ (rendimento do produto em relação ao substrato) maior (0,41) do que o apresentado aqui, fator influenciado pela maior quantidade de glicerol utilizada na condição otimizada. Porém, ao se comparar a produtividade volumétrica (Q_p , g/L.h) verifica-se que a condição desenvolvida neste trabalho apresenta um valor aproximadamente 40% maior que o apresentado por Monteiro (2007), fato que está relacionado ao menor tempo de cultivo necessário na condição aqui desenvolvida para produção dos ramnolipídeos.

TABELA 8. COMPARAÇÃO ENTRE OS RENDIMENTOS E PRODUTIVIDADES DE RAMNOLIPÍDEOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Referências	Glicerol (g/L)	Fonte de Nitrogênio (g/L)	Ramnolipídeos (g/L)	Yp/s	t (h)	Qp (g/L.h)
Este trabalho	40	NaNO ₃ (5)	15,9	0,39	168	0,095
Monteiro, 2007	30	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1)	12,4	0,41	216	0,057

Yp/s - coeficiente de rendimento do produto formado em relação ao consumo de substrato (biossurfactante/glicerol), **Qp** - produtividade volumétrica - quantidade de produto/L de cultivo x h.

Tendo por base estes resultados, foi realizada uma nova fermentação, onde se optou por utilizar a estratégia de alimentar a fermentação após um determinado período de crescimento com fonte de carbono (batelada alimentada), objetivando manter a produção de ramnolipídeos na fase ascendente, visto que foi verificado que o esgotamento da fonte de carbono influencia diretamente na redução da velocidade de produção dos ramnolipídeos. Com base nos dados apresentados na FIGURA 17 optou-se por alimentar a fermentação no terceiro dia, com as seguintes fontes de carbono: óleo de soja (32,0 g/L) e glicerol (32,4 g/L). Para auxiliar na solubilização, as fontes de carbono foram previamente solubilizadas na concentração de 0,8 g/mL, utilizando meio de cultivo isento de glicerol como diluente.

Como pode ser observado na FIGURA 18, o processo de batelada alimentada proporcionou um aumento de até 25% na produção de ramnolipídeos, quando alimentado com óleo de soja, contrastando com os experimentos onde a fermentação foi alimentada com glicerol, que apresentou um rendimento de ramnolipídeos menor (17%) do que o apresentado pelo controle. Provavelmente isto se deva aos efeitos difusionais causados por adição de glicerol ao meio, como já constatado em experimentos anteriores.

Para os experimentos subseqüentes, foi adotada a condição otimizada sem alimentação com óleo de soja, pois a adição deste composto poderia dificultar a extração e a purificação dos ramnolipídeos, necessitando, por isso, de otimização do método de extração, o que não era objetivo do presente trabalho.

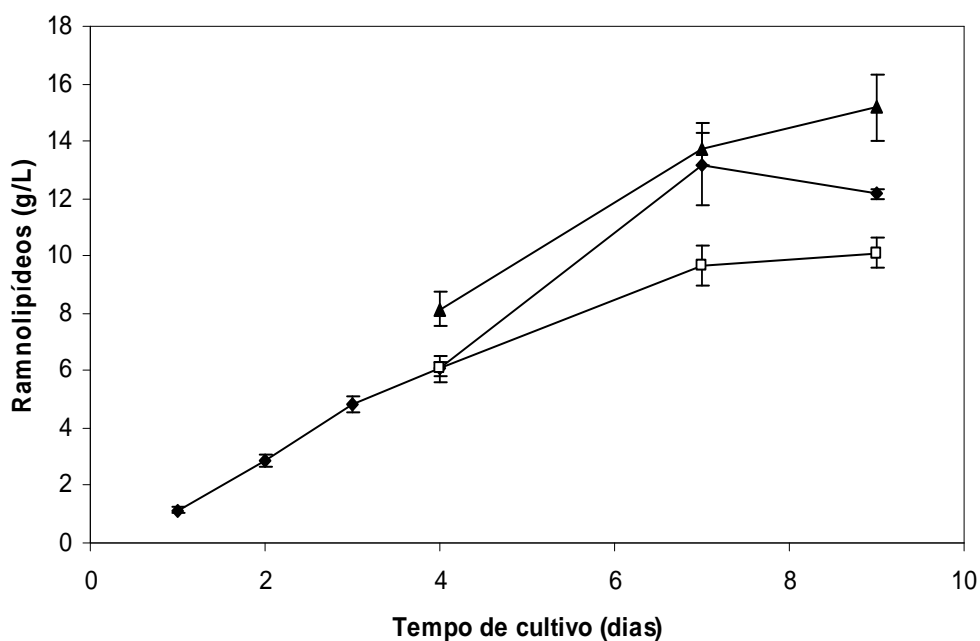


FIGURA 18. EFEITO DO PROCESSO DE ALIMENTAÇÃO DA FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

No 3º dia de crescimento (76 h) foi realizada uma alimentação do meio com glicerol (32,4 g/l) (□), e óleo de soja (32,0) (▲). O controle (◆) não sofreu alimentação. Fonte de nitrogênio: NaNO_3 (5 g/L). Condições: 30°C e 200 rpm.

5.4. Avaliação da variação da composição molecular e estrutural da mistura de ramnolipídeos durante o cultivo

Um dos objetivos deste trabalho foi estudar a variação da composição dos homólogos da mistura produzida por *P. aeruginosa* nas condições de cultivo otimizadas em experimentos anteriores. Para tanto, as amostras produzidas no experimento mostrado na FIGURA 17 (correspondentes ao 1º, 2º, 4º, 7º e 9º dias) foram submetidas à extração com solventes orgânicos como descrito no item 4.6. e ressolubilizadas em metanol, sendo posteriormente diluídas em água deionizada e submetidas à análise no espectrômetro de massas acoplado ao eletrospray. Os espectros de massa obtidos estão mostrados na FIGURA 19

As abundâncias relativas de cada homólogo mostradas na TABELA 9 foram calculadas conforme descrito no item 4.7.7. Para melhor visualização da variação dos homólogos, as abundâncias relativas foram plotadas contra o tempo de cultivo (FIGURA 20a)

e as concentrações, obtidas pela multiplicação das abundâncias relativas de cada homólogo pelo teor de ramnose da amostra, estão mostradas na FIGURA 20b.

TABELA 9. ESTRUTURA QUÍMICA E ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS HOMÓLOGOS PRESENTES NA MISTURA DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO

Tempo de fermentação (dias)	Estrutura	[M – H] m/z	Abundância relativa (%)				
			1	2	4	7	9
	Rha-C ₈ -C ₁₀	476	2,5	3,3	4,4	4,1	4,2
	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	504	47,3	36,9	21,8	13,9	17,2
	Rha-C ₁₀ -C ₁₂	531	13,2	8,5	4,4	3,4	3,2
	Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀	622	0,0	2,0	8,2	9,9	9,5
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	650	24,5	40,0	52,9	59,6	57,7
	Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	678	12,6	12,6	8,3	9,1	8,11

Condições de cultivo: 40 g/L de glicerol e 5 g/L de NaNO₃, conforme FIGURA 17. As amostras foram solubilizadas na concentração de 1 g/L, a exceção da amostra correspondente ao 1º dia de cultivo, que foi solubilizada na concentração de 0,3 g/L.

Os homólogos predominantes na mistura de ramnolipídeos, em todos os tempos analisados, correspondem ao monorramnolipídeo Rha-C₁₀-C₁₀ e ao dirramnolipídeo Rha₂-C₁₀-C₁₀, sendo que a soma destes dois homólogos corresponde à aproximadamente 75% do total de ramnolipídeos produzidos, independentemente do tempo de cultivo, corroborando os resultados anteriormente reportados por muitos autores (MONTEIRO *et al.*, 2007; SOBERÓN-CHAVEZ *et al.*, 2005; MAIER & SÓBERON-CHÁVEZ, 2000; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999).

Os homólogos presentes em menores quantidades (TABELA 9) foram Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha₂-C₈-C₁₀, Rha₂-C₁₀-C₁₂, perfazendo, juntamente com os homólogos principais, um total de 6 homólogos, os quais foram detectados em todos os tempos de cultivo, excetuando-se a ausência do homólogo Rha₂-C₈-C₁₀ no primeiro dia. Este é um número menor do que o obtido por Monteiro *et al.* (2007), que reportaram 12 homólogos incluindo os monorramnolipídeos (6) Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1} e Rha-C₁₂-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂ e os dirramnolipídeos (6) Rha₂-C₁₀-C₁₀, Rha₂-C₁₀-C₈, Rha₂-C₈-C₁₀, Rha₂-C₁₀-C_{12:1}, Rha₂-C₁₂-C₁₀ e Rha₂-C₁₀-C₁₂.

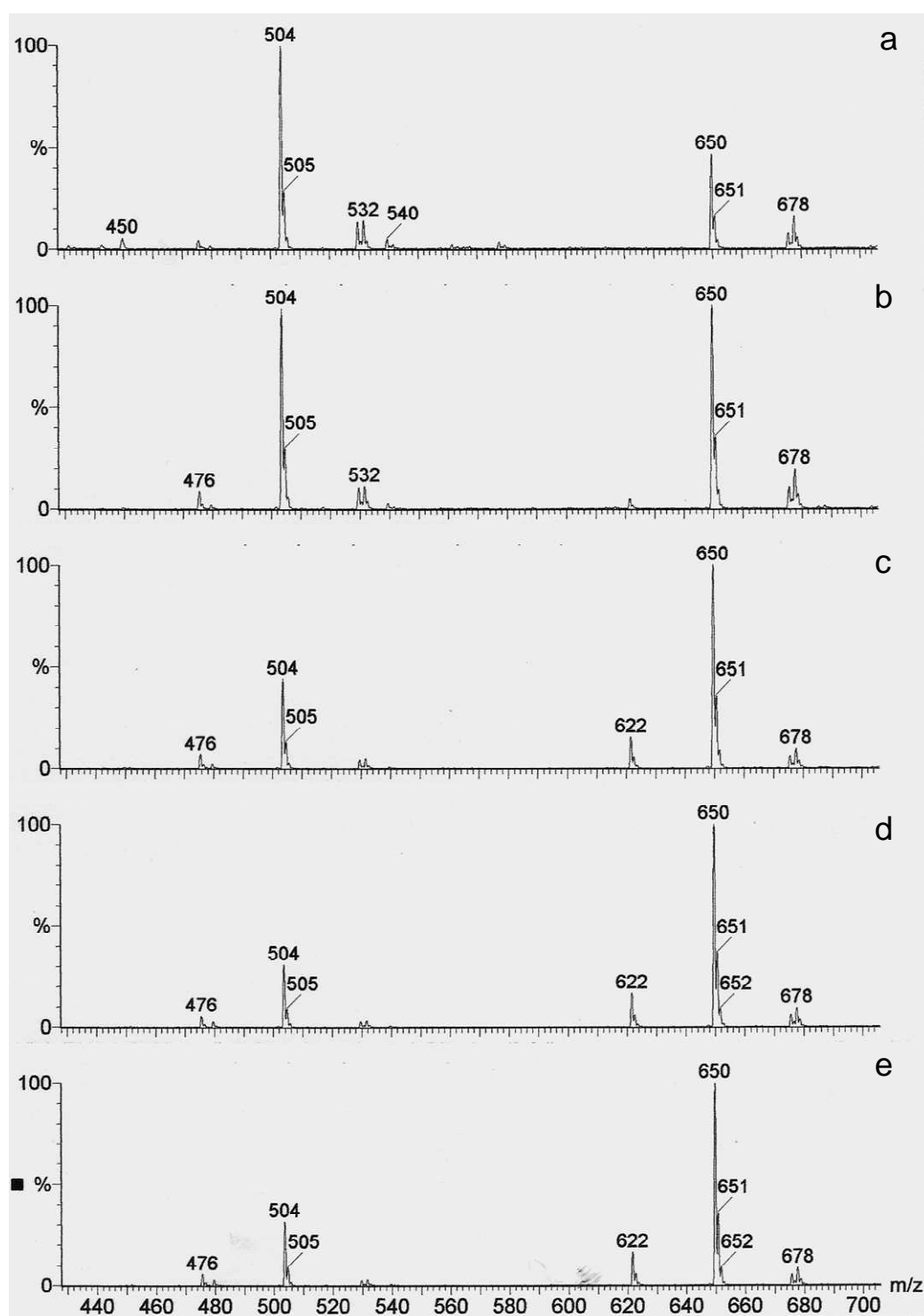


FIGURA 19. ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS COM AS AMOSTRAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO, CONFORME AS CONDIÇÕES SELECIONADAS NO ITEM 5.2

As letras a, b, c, d, e correspondem aos tempos de fermentação de 1, 2, 4, 7 e 9 dias, respectivamente.

Estas diferenças de números de homólogos para a mesma cepa apresentadas acima podem ser explicadas pela metodologia utilizada. No presente trabalho não foram feitas as fragmentações dos íons necessárias (utilizando o modo de análise MS-MS) para a identificação dos isômeros com alterações na disposição da cadeia lipídica em relação à molécula de ramnose, ou de insaturações na cadeia lipídica, pois o objetivo principal aqui era o de verificar a variação, em função do tempo, da composição dos principais homólogos Rha₂-C₁₀-C₁₀ e Rha-C₁₀-C₁₀.

Nas primeiras horas da fermentação (FIGURA 20a, b), há um predomínio do homólogo Rha-C₁₀-C₁₀, correspondendo, no primeiro dia, a aproximadamente 50% do total de ramnolipídeos produzidos. Porém, já no 2º dia de fermentação a quantidade do homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₀ já se iguala a de seu correspondente monorramnolipídeo. Nos outros tempos, há um predomínio dos homólogos de dirramnolipídeos (69, 79 e 75%, nos tempos de fermentação de 4, 7 e 9 dias, respectivamente), com destaque para o Rha₂-C₁₀-C₁₀, que chega a representar, sozinho, 60% do total de homólogos produzidos.

Comparando-se os resultados das análises estruturais com o trabalho de Monteiro *et al.*, (2007) (FIGURA 21), onde se utilizou sulfato de amônio (1 g/L) como fonte de nitrogênio e glicerol (30 g/L) como fonte de carbono, para os seis homólogos comuns aos dois trabalhos, pode-se verificar que a condição utilizada no presente trabalho (40 g/L de glicerol e 5 g/L de NaNO₃) produz uma razão monorramnolipídeo:dirramnolipídeo ($R_{mo:di}$) de 0,33, enquanto que no trabalho de Monteiro *et al.* (2007), a $R_{mo:di}$ obtida foi de 0,95, para o mesmo tempo de cultivo (9 dias). Houve variações também nos homólogos menos abundantes Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha₂-C₈-C₁₀, Rha₂-C₁₀-C₁₂, ressaltando-se que, na condição do presente trabalho, em geral, a produção dos homólogos de dirramnolipídeos foi favorecida, com todos os homólogos de monorramnolipídeos em proporções menores que os obtidos no estudo de Monteiro *et al.* (2007). Em conclusão, os resultados mostram que as condições utilizadas no presente trabalho favoreceram a produção de dirramnolipídeos.

Poucos estudos descrevem a variação ao longo do tempo da proporção entre os homólogos de ramnolipídeos produzidos por cepas de *P. aeruginosa*, com resultados muitas vezes contraditórios, como descrito a seguir. Como já mencionado anteriormente, esses resultados divergentes podem ser consequência de diversos fatores, sendo os principais deles, a cepa de *P. aeruginosa* utilizada, as fontes de carbono e nitrogênio fornecidas ao microrganismo durante a fermentação e a metodologia analítica utilizada para a determinação estrutural.

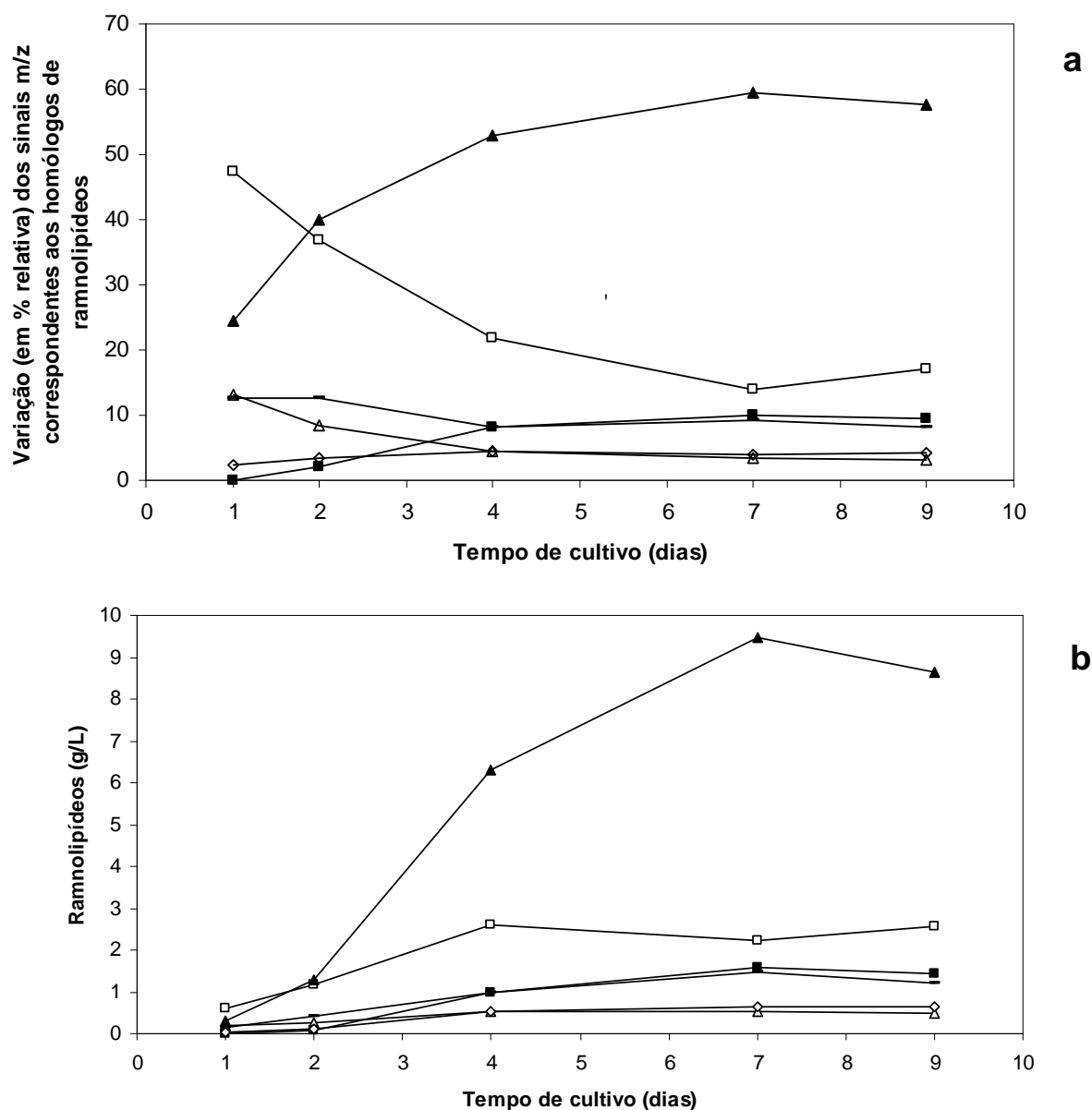


FIGURA 20. VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS HOMÓLOGOS DE RAMNOLIPÍDEOS COM O TEMPO DE CULTIVO PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

(a) - Variação dos sinais de massa carga (m/z) correspondentes aos homólogos de mono e dirramnolipídeos (b) variação da concentração dos homólogos (em ramnolipídeos). Legenda: ◇ - 476 (Rha-C₈-C₁₀), □ - 504 (Rha-C₁₀-C₁₀), △ - 531 (Rha-C₁₀-C₁₂), ■ - 622 (Rha₂-C₈-C₁₀), ▲ - 650 (Rha₂-C₁₀-C₁₀), — - 678 (Rha₂-C₁₀-C₁₂). Em (b) os valores obtidos foram multiplicados pelas dosagens de ramnose.

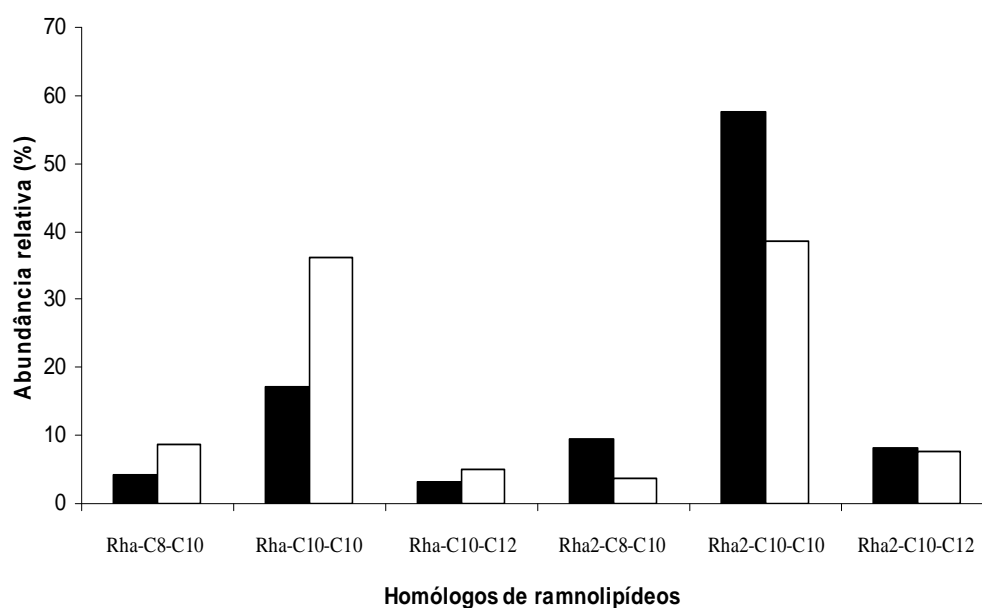


FIGURA 21. COMPARAÇÃO ENTRE HOMÓLOGOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Experimentos realizados na condição reportada por Monteiro *et al.* (2007) (□), e no presente trabalho (■) no mesmo tempo de cultivo.

Nos resultados apresentados por Haba *et al.* (2003) e Deziel *et al.* (2000), o homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₀ é o predominante a partir do 3º ou 4º dia de fermentação, já no estudo de Schenk *et al.* (1995), os autores descrevem uma proporção inversa à apresentada na FIGURA 19, ou seja, o homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₀ ocorre em menor proporção que o homólogo Rha-C₁₀-C₁₀, com este último tendendo ao aumento a partir do 2º dia de fermentação.

A produção preferencial de dirramnolipídeos em detrimento dos monorramnolipídeos é relatada por diversos autores, com diferentes tempos de cultivo (WEI *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2007; NITSCHKE *et al.*, 2005; BENINCASA *et al.*, 2004; DEZIEL *et al.*, 2000), sendo que todos estes autores utilizaram substratos glicídicos como fonte de carbono. Da mesma forma, uma predominância de monorramnolipídeos é relatada por outro grande número de trabalhos (WEI *et al.*, 2008; PORNSUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2006; NITSCHKE *et al.*, 2005; ABALOS *et al.*, 2001), onde os autores utilizam substratos lipídicos. E, de maneira controversa, outros estudos citam a predominância de monorramnolipídeos com o uso de substratos glicídicos e de dirramnolipídeos com o uso de substratos lipídicos (WEI *et al.*, 2008; BENINCASA & ACCORSINI, 2008; HABA *et al.*, 2003; SCHENK *et al.*, 1995).

5.6. Propriedades físico-químicas do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Para avaliar as propriedades físico-químicas das misturas de ramnolipídeos produzidas por *P. aeruginosa*, foram determinados a concentração micelar crítica (CMC) e o índice de emulsificação (E_{24}). Para isso, as amostras correspondentes ao 1º, 2º, 4º, 7º e 9º dias de fermentação (referentes ao cultivo da FIGURA 17) foram submetidas à extração com solventes orgânicos, como descrito no item 4.6., secas e pesadas e ressolubilizadas em água destilada na concentração de 0,1% (m/v). No caso da amostra correspondente a 24 h de fermentação, pelo seu maior teor de monoramnolipídeos, conseguiu-se solubilizar apenas uma quantidade de 0,03%, ao invés dos 0,1% propostos inicialmente. Foram então realizadas dosagens de ramnose como descrito no item 4.7.5, com o objetivo de se determinar a quantidade ramnolipídeos presentes em cada uma das soluções, visto que, durante o processo de extração, muitos compostos produzidos por *P. aeruginosa* podem se dissolver na fase orgânica utilizada (clorofórmio:metanol 3:1), como por exemplo a piocianina, pigmento responsável pela cor esverdeada desenvolvida pelas culturas de *P. aeruginosa* em meios líquidos e sólidos (HASSETT *et al.*, 1992).

Realizadas as dosagens de ramnose nas amostras, foram aplicados novos fatores de conversão (calculados como mostrado no Anexo 6), obtidos com o auxílio das determinações estruturais, obtendo-se assim a concentração de ramnolipídeos na solução preparada.

5.6.1. Concentração Micelar Crítica (CMC) e Índice de Emulsificação (E_{24})

Os resultados de TS foram plotados contra as concentrações e os valores de CMC foram calculados pelo ponto de inflexão na curva (Anexos 1 - 5) como descrito no item 4.7.3 de materiais e métodos. Na TABELA 10 estão mostrados os valores de CMC e E_{24} obtidos para os diferentes tempos de cultivo.

Neste trabalho, apenas a CMC da mistura de ramnolipídeos correspondente ao primeiro dia de fermentação (15,6 mg/L) diferiu significativamente das demais, (TABELA 10). Para os índices de emulsificação também se verificou que as amostras correspondentes aos primeiros dias (1º e 2º dias) praticamente não estabilizaram as emulsões de querosene e gasolina ($E \cong 0$), quando comparadas às dos tempos maiores de cultivo (9 dias, 77,2, 59,0 e 71,1 respectivamente, para o diesel, gasolina e querosene).

TABELA 10. RELAÇÃO ENTRE A COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL DAS AMOSTRAS DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO, E AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS APRESENTADAS.

Dias	% Rha-C ₈ -C ₁₀	% Rha-C ₁₀ -C ₁₀	% Rha-C ₁₀ -C ₁₂	% Rha ₂ -C ₈ -C ₁₀	% Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	% Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	%mono	% di	CMC (mg/L)	E ₂₄ D	E ₂₄ G	E ₂₄ Q
1	2,46	47,25	13,21	0,00	24,50	12,59	62,91	37,09	15,6	0	0	0
2	3,30	36,92	8,51	1,99	39,96	12,62	48,72	54,58	28,4	51	0	5
4	4,36	21,84	4,42	8,18	52,92	8,28	30,62	69,38	30,0	74	58	72
7	4,08	13,93	3,40	9,89	59,57	9,14	21,40	78,60	30,3	77	62	59
9	4,23	17,18	3,24	9,54	57,71	8,11	24,65	75,35	31,2	77	59	72

Condições: 40 g/L de glicerol e 5 g/L de NaNO₃. Legenda: TS: tensão superficial. CMC: concentração micelar crítica; E₂₄: índice de emulsificação – D: diesel, G: gasolina, Q: querosene.

Estes resultados acima certamente são influência da composição da amostra que, em 24 h, contém aproximadamente 60% de monorrhamnolipídeos e com nove dias já apresenta 75% de dirramnolipídeos. Isto sugere que a presença dos dirramnolipídeos cause um aumento da CMC na mistura. Estes resultados são sustentados pela literatura, onde a presença de uma unidade adicional de rarnnose confere maior hidrofiliçidade ao dirramnolipídeo em comparação ao mono, e assim concentrações maiores de dirramnolipídeos são necessárias para se estabelecer a formação de micelas, aumentando o valor da CMC (ABALOS *et al.*, 2001).

Camílios Neto *et al.* (2009) analisaram as propriedades físico-químicas do mesmo biossurfactante, mas produzido por fermentação sólida e demonstraram que o monorrhamnolipídeo apresenta uma menor CMC e índice de emulsificação menor em relação ao dirramnolipídeo. Estes autores reportaram valores de CMC de 31,7 e 58,9 mg/L para os homólogos (isolados) de mono e dirramnolipídeos, respectivamente, e de 48,3 mg/L para a mistura de homólogos, valor este muito próximo ao encontrado por Monteiro *et al.*, (2007) - 44,5 mg/L – para o extrato contendo os rarnnolipídeos produzidos pela mesma bactéria cultivada em meio líquido. Camílios Neto *et al.* (2009) não avaliaram a proporção dos principais homólogos na mistura, mas Monteiro *et al.* (2007) apresentaram um $R_{mo:di}$ de 0,95, contra 0,33 obtido no presente trabalho, o que pode justificar a diferença nos resultados.

Em relação ao índice de emulsificação, embora a amostra referente ao primeiro dia de fermentação tenha apresentado um valor de CMC menor (15,6 mg/L), esta mesma amostra apresentou os piores resultados nas análises de E_{24} , e mesmo a amostra correspondente ao segundo dia de fermentação, que apresentou uma CMC de 28,4 mg/L (valor muito próximo aos das amostras correspondentes ao 4º, 7º e 9º dias de fermentação), não apresentou valores de E_{24} comparáveis aos apresentados pelas demais amostras.

Relacionando-se as composições estruturais das amostras com as propriedades físico-químicas encontradas (TABELA 10), e analisando-se a composição estrutural da amostra referente ao 2º dia de cultivo, verifica-se que ela possui mais de 50% de dirramnolipídeos em sua composição (54%); porém, de acordo com os dados da TABELA 10, observa-se que destes 54%, 39% correspondem ao homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₀, 12% ao homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₂ e 2% ao homólogo Rha₂-C₈-C₁₀ (que não foi detectado no primeiro dia de fermentação). Embora o efeito negativo do índice de emulsificação nos dois primeiros dias de fermentação possa estar relacionado à maior porcentagem presente do Rha₂-C₁₀-C₁₂ (12%), que, devido a sua maior cadeia carbônica de ácido graxo β-hidroxilado, possui propriedades mais hidrofóbicas que os demais homólogos, os homólogos que certamente influenciaram os

resultados de E_{24} são Rha₂-C₈-C₁₀ e Rha₂-C₁₀-C₁₀. O primeiro tem sua quantidade aumentada em quatro vezes do segundo para o quarto dia de fermentação, (de 2 para 8% do total de ramnolipídeos presentes). Comparando os valores presentes do homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₀ no 2º dia de fermentação e no 4º, 7º e 9º dias verifica-se uma diferença mais acentuada (chegando a um máximo de 20%) entre as proporções presentes. Sendo assim, pode-se inferir que nas amostras correspondentes ao 1º e 2º dias de fermentação os resultados inferiores obtidos nas análises de E_{24} são devidos à ausência de proporções maiores dos homólogos Rha₂-C₁₀-C₁₀ e Rha₂-C₈-C₁₀. Utilizando o mesmo raciocínio nas amostras correspondentes ao 4º, 7º e 9º dias de cultivo explicam-se os resultados superiores obtidos com essas amostras nas análises de E_{24} .

A polaridade da molécula parece ser o fator chave para se explicar o comportamento dos ramnolipídeos em relação a CMC e a E_{24} . Para se determinar a CMC, a amostra é diluída em água, favorecendo a interação de homólogos mais polares, principalmente dirramnolipídeos, mas também monorramnolipídeos com menores números de carbono na cadeia de ácido graxo β -hidroxilado, ou mesmo aqueles ramnolipídeos com apenas uma cadeia lateral de ácido graxo. Assim a solubilidade em água é favorecida com o aumento da polaridade da molécula, e a concentração necessária para a formação de micelas, conseqüentemente, é maior. Já as moléculas com maior caráter hidrofóbico sofrem repulsão de suas cadeias apolares pelas moléculas de água, e essas cadeias tendem a se agregar para diminuir essa repulsão, favorecendo a formação de estruturas supramoleculares, como micelas e bicamadas, com concentrações menores do biossurfactante presente. Assim, valores de CMC menores são encontrados para misturas ricas em monorramnolipídeos (SÁNCHEZ *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 1997; ZHANG & MILLER, 1995).

Já na presença de solventes hidrofóbicos, as moléculas mais apolares, como os monorramnolipídeos com maiores cadeias de ácidos graxos β -hidroxilados, tendem a se dissolver na forma de micelas invertidas, ou seja, a cauda apolar aponta para o exterior da micela, enquanto que a porção polar contendo a unidade de rãnose interage uma com a outra e com a água no interior da micela (SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Nas determinações de E_{24} , as amostras de tempos de cultivo onde havia mais moléculas de monorramnolipídeos apresentaram os piores resultados provavelmente devido a esse comportamento.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. Otimização das condições da produção de ramnolipídeos

Os resultados obtidos nos experimentos com base nas indicações propostas por Monteiro (2007) não propiciaram o aumento da produção de ramnolipídeos. O aumento da relação C/N por meio da diminuição da quantidade de nitrogênio, ou por meio do aumento da quantidade de glicerol não proporcionou aumento de produção de ramnolipídeos. Apenas o aumento da concentração de inóculo (para 4%) e do tempo de cultivo propiciaram resultados que foram explorados nos experimentos posteriores.

6.2. Triagem dos componentes do meio de fermentação

Com os resultados obtidos, foi possível selecionar a fonte de nitrogênio (NaNO_3) e sua concentração (5 g/L) e a concentração de fonte de carbono (glicerol, 40 g/L) que possibilitaram o maior rendimento de ramnolipídeos (15,9 g/L, utilizando um fator de conversão de 3,2), com 168 horas de cultivo.

6.3. Cinética de produção de ramnolipídeos utilizando as condições selecionadas

Com as condições selecionadas, foi possível realizar a cinética de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614, observando que existe uma relação direta entre o consumo de glicerol e a produção de ramnolipídeos, e que a estratégia de batelada alimentada com óleo de soja se mostra promissora para a obtenção de níveis maiores de ramnolipídeos.

6.4. Avaliação da variação da composição molecular e estrutural da mistura de ramnolipídeos durante o cultivo

As análises de ESI-MS permitiram elucidar a composição da mistura de homólogos produzida na condição otimizada de cultivo, (5 g/L de NaNO₃ e 40 g/L de glicerol). Foram encontrados seis homólogos (9 dias de cultivo), dos quais os predominantes são o monoramnolipídeo Rha-C₁₀-C₁₀ e o dirramnolipídeo Rha₂-C₁₀-C₁₀, sendo que a soma destes dois homólogos corresponde à aproximadamente 75% do total de ramnolipídeos produzidos, independentemente do tempo de cultivo. Os homólogos presentes em menores quantidades foram Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha₂-C₈-C₁₀, Rha₂-C₁₀-C₁₂.

Nas primeiras horas de cultivo há um predomínio do homólogo Rha-C₁₀-C₁₀, correspondendo, no primeiro dia, a aproximadamente 50% do total de ramnolipídeos produzidos. Porém, já no 2º dia de fermentação a quantidade do homólogo Rha₂-C₁₀-C₁₀ já se iguala a de seu correspondente monoramnolipídeo. Nos outros tempos há um predomínio dos homólogos de dirramnolipídeos (69, 79 e 75%, nos tempos de fermentação de 4, 7 e 9 dias, respectivamente), com destaque para o Rha₂-C₁₀-C₁₀, que chega a representar, sozinho, 60% do total de homólogos produzidos.

6.5. Propriedades físico-químicas das misturas de homólogos de ramnolipídeos produzidas em diferentes tempos de cultivo

As misturas de homólogos de ramnolipídeos produzidas por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 apresentaram valores de CMC e E_{24} que variaram de acordo com o tempo de cultivo. Valores menores de CMC foram encontrados para os primeiros tempos de fermentação (1º e 2º dias), mas a mistura produzida não foi capaz de emulsificar o querosene e a gasolina. A comparação desses dados com as informações provenientes das análises estruturais permite concluir que a composição estrutural da mistura de ramnolipídeos e a proporcionalidade dos diferentes homólogos produzidos em diferentes tempos de cultivo influencia diretamente nas propriedades físico-químicas da mistura de ramnolipídeos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A.; MAXIMO, F.; MANRESA, M. A.; BASTIDA, J. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. **Journal of Chemical Technology And Biotechnology**, v. 77, p. 777-784, 2002.

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

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223 p. 143–151, 2008.

ALONSO, A.; ROJO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. **Environmental Microbiology**, v. 1(5), p. 421-430, 1999.

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

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

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85 p. 1–8, 2004.

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

BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology** v. 96, p. 1049–1055, 2005.

BERGSTROM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. **Avkives Kemi Mineralogy Geology**, v. 28 (13), 1947.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.

BONILLA, M; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, M.; SOUBES, M Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 456-463, 2005.

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

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

CAMILIOS NETO *et al.*, 2009. **Biotechnology Journal** (2009), submetido.

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

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53 (2), p. 224-229, 1987.

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

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 47-64, 1997.

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

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D. ; MAMER, O.A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1440, p. 244-252, 1999.

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

GARCIA-JUNCO, M.; OLMEDO, E.; ORTEGA-CALVO, J. Bioavailability of solid and non aqueous phase liquid (NAPL) dissolved phenanthrene to the biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 561-589, 2001.

GUERRA-SANTOS, L. H.; KAPPELI, O.; FIEEHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 443-448, 1986.

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

HABA, E.; ABALOS, A.; JÁUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, A. Use of liquid chromatography–mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6 (2), p. 155-162, 2003.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HASSETT, D.J.; CHARNIGA, L.; BEAN, K.; OHMAN, D.E.; COHEN, M.S. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. **Infection and Immunology**, v. 60 (2), p. 328-336, 1992.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). **The journal of Antibiotics**, v. 24 (12), 1971.

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

KIM, S. K.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.1 (84), p. 41-46, 1997.

KRÜSS. Processor Tensiometer K12. Hamburg, Manual, 1994.

KUMAR, M.; LEÓN, V.; MATERANO, A.D.S.; ILZINS, O.A.; LUIS, L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 24, p. 1047–1057, 2008.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I.B.; MAKAROV, S.O.; LITVINENKO L.V.; CUNNINGHAM, C. J.; PHILP, J.C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. **Environment International**, v. 31, p. 155 – 161, 2005.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

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

LIN, S. C.; LIN, K. G.; LO, C. C.; LIN, Y. M. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p.267-273, 1998.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography A.**, v. 864, p. 211-220, 1999.

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

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Scientific Technology**, v. 27(3), p. 675-683, 2005.

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

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

MONTEIRO, S. A.; SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 146, p.1-13, 2007.

MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T.V. de in: Atheneu (Eds), **Técnicas de Laboratório**, São Paulo 3 ed, p. 63-64, 1998.

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

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

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55 (11), p. 3016-3019, 1989.

NIELSEN, T. H.; CHRISTOPHERSEN, C.; ANTHONI, U.; SORENSEN, J. Visconamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 80-90, 1999.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology** v. 97, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. 2003. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 106, p. 295–302, 2003.

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

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

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.

OCHSNER, A.U.; KOCH, A.K.; FIECHTER, A.; REISER, R. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2044-2054, 1994.

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

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 1997.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO2-1. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.72, p.132-138, 2006.

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

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

RON, Z.E.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3 (4), p. 229-236, 2001.

SALAGER, JEAN-LOUIS. Surfactants: types and uses. Laboratory of formulation, interfaces, rheology and processes. Universidad de los andes. Facultad de ingeniería. Mérida, Venezuela, 2002.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ESPUNY, M.J.; MÁRQUES, A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a rhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.307, p. 246-253, 2007.

SANTOS, S.A. Produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. 109 f. Tese (Doutorado em Ciência Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

SASSAKI, G.L.; CRUZ, L.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study. **Lipids**, v. 36 (2), p. 1-8, 2001.

SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography A**, v. 693, p. 7-13, 1995.

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

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

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

SOLONI, F.G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry**, v. 17, p. 529-534, 1971.

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from *n*-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. **Z. Naturforsch**, v. 4c, p. 61-67, 1985.

WEI, Y.H.; CHENG, CHIEH-LUN; CHIEN, CHIH-CHING; WA, HISAO-MING. Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 764-774, 2008.

WHANG, L.M.; LIU, P.W.G.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 155–163, 2008.

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

ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of *n*-alkanes. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 61 (6), p. 2247–2251, 1995.

ZHANG, Y.; MAIER, W.J.; MILLER, R.M. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. **Environmental Science Technology**, v. 31, p. 2211-2217, 1997.

ANEXOS

ANEXO 1. CURVAS DE CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DE BISSURFACTANTE CONTRA A TENSÃO SUPERFICIAL

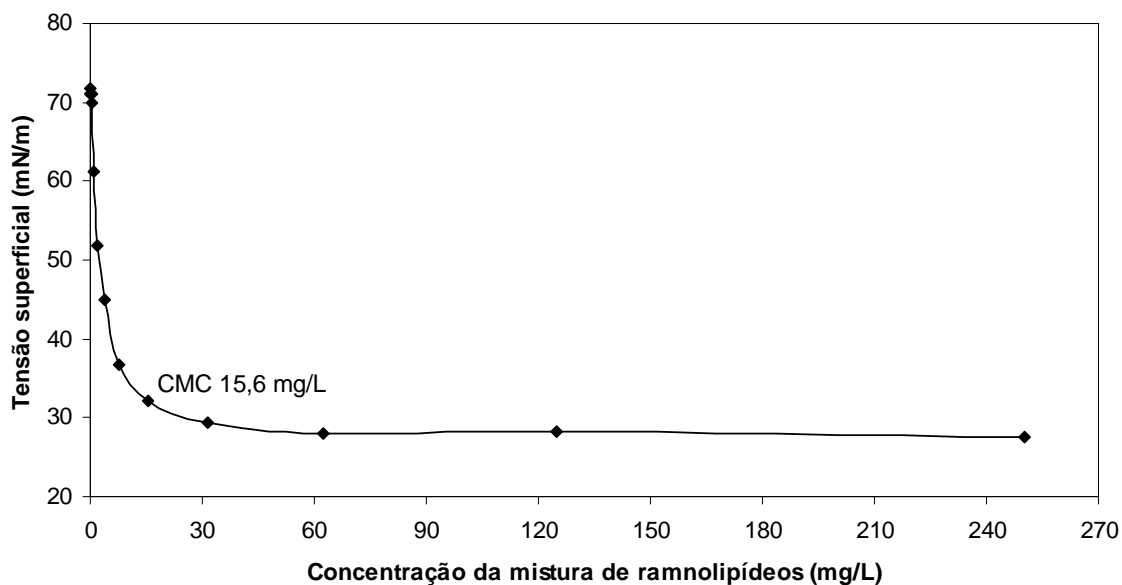


Figura a1. Concentração micelar crítica da mistura de ramnolipídeos correspondente ao 1º dia de fermentação (24 h), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e as condições de fermentação descritas no item 5.2. A concentração inicial da amostra era de 0,3 g/L.

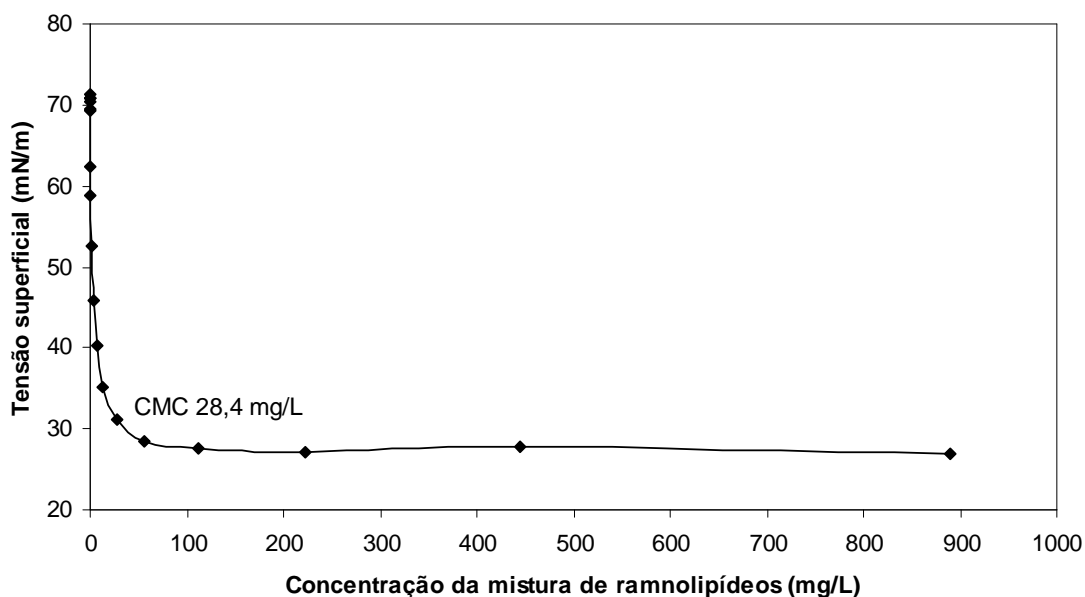


Figura a2. Concentração micelar crítica da mistura de ramnolipídeos correspondente ao 2º dia de fermentação (48 h), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e as condições de fermentação descritas no item 5.2. A concentração inicial da amostra era de 1 g/L.

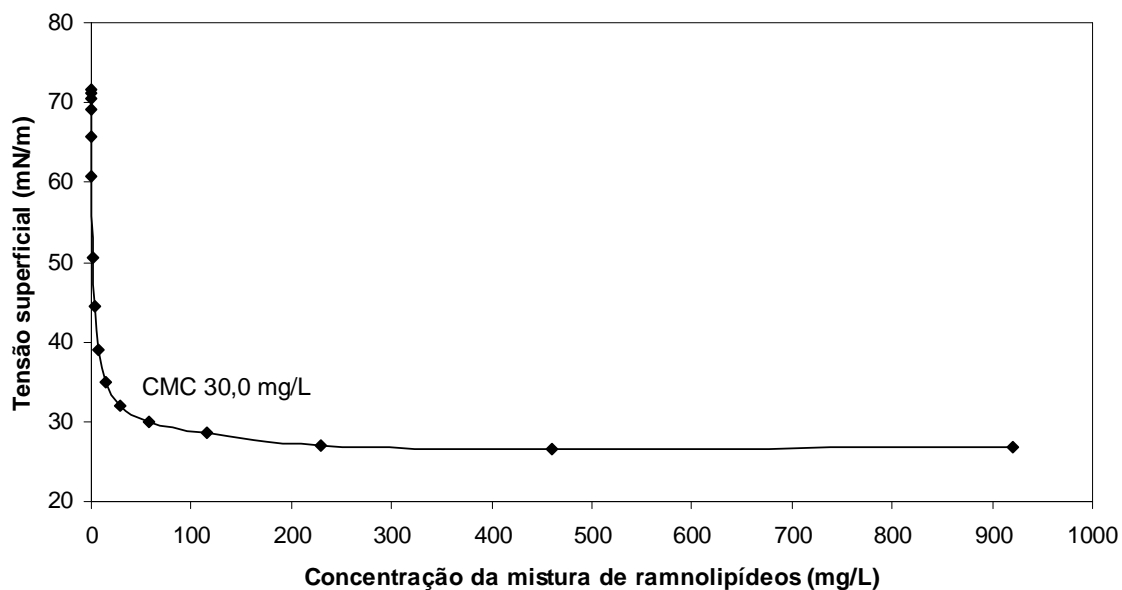


Figura a3. Concentração micelar crítica da mistura de ramnolipídeos correspondente ao 4º dia de fermentação (96 h), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e as condições de fermentação descritas no item 5.2. A concentração inicial da amostra era de 1 g/L.

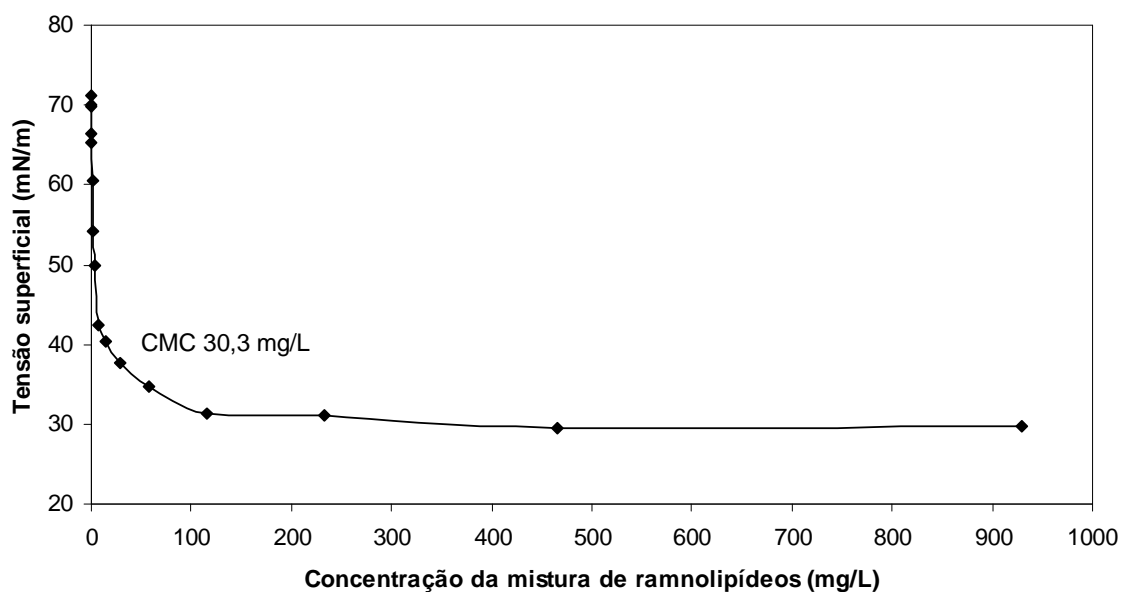


Figura a4. Concentração micelar crítica da mistura de ramnolipídeos correspondente ao 7º dia de fermentação (168 h), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e as condições de fermentação descritas no item 5.2. A concentração inicial da amostra era de 1 g/L.

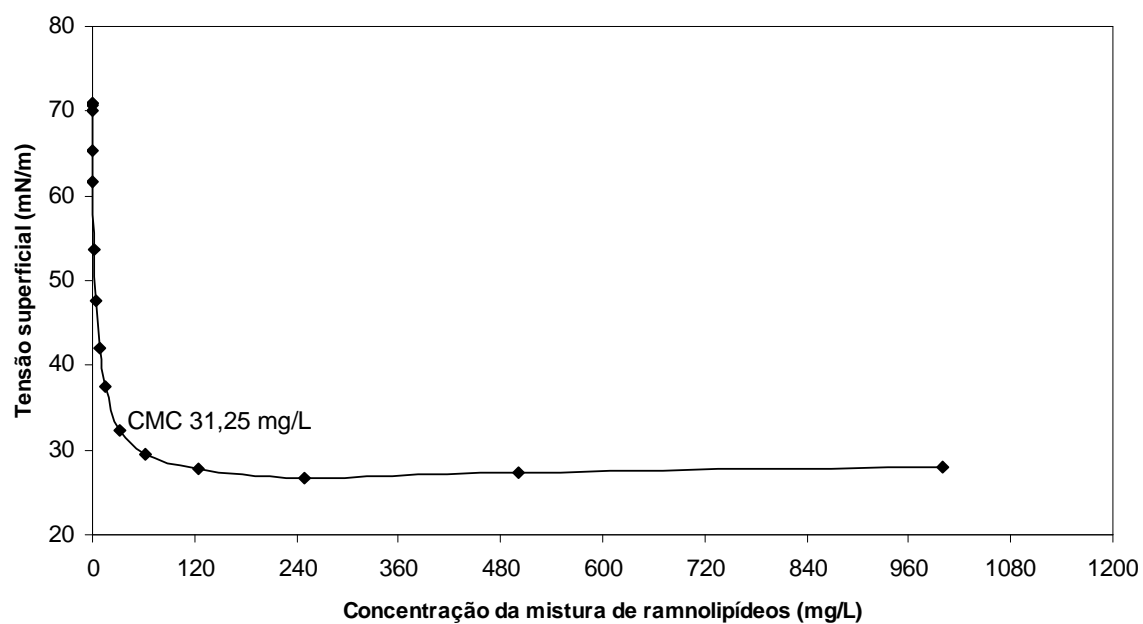


Figura a5. Concentração micelar crítica da mistura de ramnolipídeos correspondente ao 9º dia de fermentação (192 h), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e as condições de fermentação descritas no item 5.2. A concentração inicial da amostra era de 1 g/L.

ANEXO 2. CÁLCULOS DOS FATORES DE CONVERSÃO

Com os dados obtidos no espectrômetro de massas, foi possível avaliar a proporção existente entre os homólogos de ramnolipídeos em diferentes tempos de cultivo, a partir das massas molares de cada homólogo e dos valores encontrados nas dosagens de ramnose, foi possível calcular um fator que possibilite a conversão dos valores (em ramnose) obtidos com a metodologia de fenol sulfúrico para os valores de ramnolipídeos, em diferentes tempos de cultivo.

Cada homólogo de ramnolipídeo possui diferentes massas molares, ao se calcular a porcentagem dessa massa que corresponde a massa molar da molécula de ramnose (ou das moléculas de ramnose, nos dirramnolipídeos) obtém-se um fator de conversão. Esse fator, porém, também dependerá da proporção em que estes homólogos irão estar presentes na mistura em determinado tempo de cultivo, assim as abundâncias relativas de cada homólogo são utilizadas para se obter o valor real do fator de conversão para cada tempo de cultivo. Abaixo, um exemplo do cálculo realizado para a amostra referente ao primeiro dia de cultivo.

M ramnose	M total de cada homólogo	% ramnose em relação à massa total do homólogo	Fator de conversão 1	% do homólogo no tempo de cultivo	Fator de conversão 2
164 (mono)	478	34,31	2,91	2,45	0,072 (a)
	505	32,48	3,07	47,24	1,455 (b)
	532	30,83	3,24	13,20	0,428 (c)
Fator de conversão para os monoramnolipídeos (soma de a + b + c)					1,955 (x)
310 (di)	623	49,76	2,01	0,00	0,00(d)
	651	47,62	2,10	24,50	0,514 (e)
	678	45,72	2,19	12,59	0,275 (f)
Fator de conversão para os dirramnolipídeos (soma de d + e + f)					0,790 (y)
Fator de conversão final (soma de x + y)					2,745

M: massa molar